

# Topographie kortikaler Rückprojektionen im visuellen System der Katze



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl. Biol. Nicole Gerlinde Jähner

aus Berlin

1. Referent:	Prof. Dr. Ralf A.W. Galuske
2. Referent:	Prof. Dr. Bodo Laube
Tag der Einreichung:	20.06.2013
Tag der mündlichen Prüfung:	22.08.2013

Darmstadt, 2013

D 17

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1 <i>Aufbau des visuellen Systems der Katze</i>	9
2.1.1 Vom Auge zum Kortex	9
2.1.2 Der visuelle Kortex der Katze	11
2.2 <i>Funktionelle Organisation des visuellen Kortex der Katze</i>	12
2.2.1 Verbindungen zwischen den Arealen des visuellen Kortex	13
2.2.2 Hierarchische Organisation	13
2.2.3 Funktioneller Aufbau des visuellen Kortex	15
2.3 <i>Einfluss von Feedback-Verbindungen</i>	17
2.4 <i>Zielsetzung</i>	18
<b>3 Methoden</b>	<b>19</b>
3.1 <i>Versuchstiere</i>	19
3.2 <i>Versuchsaufbau und Durchführung</i>	20
3.2.1 Anästhesie und Medikamentation	20
3.2.2 Chirurgische Eingriffe	21
3.2.3 Optical Imaging des intrinsischen Signals	22
3.2.3.1 Visuelle Stimulation	23
3.2.3.2 Aufnahme der Optical Imaging Daten	24
3.2.4 Tracerinjektionen	25
3.2.4.1 Tracer Dextranamine	25
3.2.4.2 Herstellung Glaskapillaren	26
3.2.4.3 Tracerinjektionen in PMLS	27
3.2.4.4 Tracerinjektionen in Area 18	28
3.2.5 Perfusion	28
3.3 <i>Histologische Gewebeaufarbeitung und Färbungen</i>	29
3.3.1 Gewebefixierung	29
3.3.2 Anfertigung von Gewebeschnitten	29
3.3.3 Prinzip der BDA-Färbung	30
3.3.4 Färbung zur Arealbestimmung und der kortikalen Schichtung	31
3.4 <i>Auswertung</i>	32
3.4.1 Analyse der Optical Imaging Daten	32
3.4.2 Histologische Auswertung	34

---

3.4.2.1	Dokumentation der Gewebeschnitte	34
3.4.2.2	Schrumpfungskorrektur	34
3.4.2.3	Neuronenverteilung und Zellkörpergröße in PMLS und im CGL	35
3.4.2.4	Axonrekonstruktion von PMLS in den primären visuellen Kortex	36
3.4.2.5	Überlagerung der rekonstruierten Axone mit den funktionellen Karten	41
3.4.2.6	Kortikalen Schichtung von PMLS, Area 17 und Area 18	42
3.4.3	Statistische Auswertung	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
4.1	<i>Injektionen in Area 18</i>	46
4.1.1	Retrograd markierte Neurone in PMLS	47
4.1.2	Retrograd markierte Neurone im Corpus geniculatum laterale	58
4.2	<i>Injektionen in PMLS</i>	59
4.2.1	Injektionsstellen in PMLS	60
4.2.2	Anterograde und retrograde Markierung von Neuronen	60
4.2.3	Organisation retrograd markierter Neurone	63
4.2.4	Globale Projektionsmuster	64
4.2.5	Feedback-Projektionen von PMLS in den primären visuellen Kortex	72
4.2.5.1	Axon 1	73
4.2.5.2	Axon 2	78
4.2.5.3	Axon 3	84
4.2.5.4	Axon 4	86
4.2.5.5	Axon 5	90
4.2.5.6	Räumliche Anordnung der Axone	95
4.2.6	Überlagerung der Axonrekonstruktionen mit den funktionellen Karten	100
4.2.7	Orientierungsspezifität der Boutons	100
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>105</b>
5.1	<i>Methodologische Überlegungen</i>	105
5.2	<i>Anatomie von Feedback-Projektionen</i>	106
5.2.1	Globale Projektionen von PMLS und Reziprozität	107
5.2.2	Feedback-Projektionen von Neuronen in PMLS	108
5.2.3	Morphologie und Morphometrie der Feedback-Verbindungen	109
5.3	<i>Funktion der Feedback-Projektionen</i>	112
5.3.1	Funktionelle Organisation der Feedback-Projektionen von Neuronen in PMLS	113
5.3.2	Modulare intrinsische Verbindungen in PMLS	115
5.3.3	Kolumnäre Organisation von Feedback-Terminationen	116
5.4	<i>Die Rolle von Feedback-Projektionen von PMLS zum primären visuellen Kortex</i>	117
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>120</b>

<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>122</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>123</b>
8.1	<i>Software</i>	123
8.2	<i>Färbemethoden</i>	123
8.2.1	BDA-Färbung	123
8.2.2	Nissl-Färbung	124
8.3	<i>Verwendete Chemikalien</i>	124
8.4	<i>Zusammensetzung verwendeter Lösungen</i>	125
8.5	<i>Versuchstiere</i>	126
8.6	<i>Medikamente</i>	126
8.7	<i>Rohdaten</i>	127
8.7.1	Neuronenverteilung in PMLS	127
8.7.2	Somafläche der retrograd markierten Neurone in PMLS	128
8.7.3	Neuronenverteilung im CGL	129
8.7.4	Axondaten	130
8.7.5	Filmübersicht	134
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>143</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>144</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>145</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>147</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

In der vorliegenden Arbeit wurden die Standard-Abkürzungen des internationalen Einheitensystems (SI: frz.: Système international d'unités) verwendet. Weitere verwendete Abkürzungen befinden sich in der folgenden Tabelle.

%	Prozent
a	anterior
A	Axon
A	Pars dorsalis A
A <sub>1</sub>	Pars dorsalis A <sub>1</sub>
AEV	Anteroektosylvisches Sehareal
ALG	Anterolaterales Gyrusareal
ALLS	Anterolateraler Teil des lateralen suprasylvischen Areals
ALMS	Anteromedialer Teil des lateralen suprasylvischen Areals
B	Pars dorsalis B
BDA	Biotinylierte Dextran Amine
CCD	Charge Coupled Device
CGL	Corpus geniculatum laterale
d	Dorsal
DA	Dextran Amin
DAB	3,3 Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid
DLS	Dorsaler Teil des lateralen suprasylvischen Areals
EVA	Ectosylvanisches optisches Areal
HRP	Meerrettichperoxidase
l	lateral
LV	Luminanz
MT	Mediotemporal
mw	molecular weight
NIM	Nucleus interlaminaris medialis
OI	Optical Imaging
p	posterior
PB	Phosphatpuffer
PLLS	Posterolateraler Teil des lateralen suprasylvischen Areals
PMLS	Posteromedialer Teil des lateralen suprasylvischen Areals
pMS	Posteromedialer suprasylvischer Kortex
PS	Posteriorer Teil des suprasylvischen Sulcus
SVA	Spleniales Sehareal
T	Terminationsgebiet
v	Ventral
V	Pars ventralis
VLS	Ventraler Teil des lateralen suprasylvischen Areals

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Für das Verständnis der Struktur und der Organisation des visuellen Systems wurde in der Vergangenheit oft das visuelle System der Katze als Modellsystem untersucht. Anhand von physiologischen und anatomischen Studien konnten Verbindungsmuster zwischen den einzelnen visuellen Arealen charakterisiert werden. Auf Basis dieser Daten ließ sich eine hierarchische Klassifizierung von interarealen Verbindungen in aufsteigende (feed-forward), absteigende (feed-back) und laterale Verbindungen vornehmen. Weiterführende Untersuchungen des Einflusses der Feedback-Verbindungen zeigten verschiedene Effekte auf die Informationsverarbeitung in den primären visuellen Arealen. Um die Rolle des kortikalen Feedbacks besser verstehen zu können, wurde in der vorliegenden Studie die Struktur der Feedback-Verbindungen zwischen dem posteromedialen suprasylvischen (pMS) Kortex und Area 18 der Katze näher untersucht.

Für die Untersuchung der Struktur der Feedback-Projektionen wurde der intrazelluläre Tracer Dextranamin mittels Druckinjektion in das Areal PMLS, das innerhalb des pMS liegt, und in Area 18 appliziert und die funktionelle Organisation von Area 18 ergänzend mit optischen Ableitungen visualisiert. Über anterogrades Tracing konnte die Struktur von einzelnen Feedback-Axonen von PMLS zu Area 18 analysiert werden und über retrogrades Tracing von Area 18 ausgehend, konnte die Organisation der Ursprungsneurone von Feedback-Projektionen in PMLS charakterisiert werden.

Die Rekonstruktionen der Axonterminalien zeigten sehr unterschiedliche Morphologien der Axone. Es wurden einerseits Terminationsfelder gefunden, die langgestreckt parallel zur Kortexoberfläche verliefen und andererseits kamen Terminationsfelder vor, die sich über mehrere kortikale Schichten in der Zielregion auffächerten. Ergänzend wurden Unterschiede in der Morphometrie der Axone analysiert. Hierbei wurden die Axone nach ihrer Gesamtlänge, der Anzahl der Verzweigungen, der Dichte der synaptischen Verknüpfungen, sowie die räumliche Anordnung der Terminationen in der Zielregion in Relation zur funktionellen Architektur hin analysiert. Die Überlagerung der funktionellen Karten und der räumlichen Anordnung der Terminationsgebiete zeigte eine Kongruenz zwischen der Lage funktioneller Domänen und der Terminationsgebiete. Die Axone zeigten ein orientierungsselektives Terminationsmuster, denn die Terminationsfelder lagen zwar in mehreren Orientierungskolumnen, die allerdings eine ähnliche funktionelle Spezifität hatten.

Die Analyse der retrograd markierten Neurone in PMLS nach Injektionen von zwei verschiedenen fluoreszierenden Dextranaminen in zwei funktionell und räumlich getrennte Bereiche in Area 18 zeigte eine topographisch spezifische Organisation auch auf der Seite der Ursprungsneurone. Die Ursprungsneurone der Projektionen nach Area 18 fanden sich

sowohl in supra- als auch in infragranulären Schichten. Die Verteilung der Neurone war jedoch in den infragranulären Schichten breiter als in den supragranulären. Auch fanden sich insgesamt mehr Neurone in den infragranulären als in den supragranulären Schichten (70% infra-, 30% supragranulär). Hinsichtlich ihrer Projektionen konnten die Neurone in zwei Gruppen unterteilt werden: Neurone, die selektiv nur zu einer der beiden Injektionsstellen projizierten, und Neurone, die zu beiden Injektionsstellen projizierten. Die unspezifisch projizierenden Neurone wiesen einen größeren Zellkörper als die spezifisch projizierenden Neurone auf und fanden sich überwiegend in den infragranulären Schichten.

Diese Daten lassen vermuten, dass es zwei unterschiedliche Arten von Feedback-Verbindungen von PMLS zu Area 18 gibt. In den supragranulären Schichten von PMLS entspringen Projektionen mit einer geringen Divergenz und hohen funktionellen Spezifität in Area 18 und aus den infragranulären Schichten entstammen Projektionen mit einer höheren Divergenz und geringen Selektivität. Diese Hypothese eines dualen Feedback-Systems wird durch physiologische Befunde unterstützt, die zeigen, dass diese Feedback-Verbindungen sowohl eine globale Rolle als Verstärkungsmechanismus besitzen als auch spezifisch richtungsselektive Neurone in ihren Feuerverhalten beeinflussen (Galuske et al., 2002, Schmidt et al., 2011).

## 2 EINLEITUNG

Die Wahrnehmung der Umwelt ist für die Entwicklung und das Überleben von Tieren von entscheidender Bedeutung. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Sinnsysteme entwickelt, die auf unterschiedliche Arten von Reizen reagieren können. Schon in der Antike unterschied Aristoteles in seinen Studien fünf Sinne: den Tast- und den Geschmackssinn, das Riechen, das Hören und das Sehen.

Nach heutigen Erkenntnissen erfolgt abhängig von der Lebensweise bis zu 80% der Umweltwahrnehmung visuell oder wird vom Sehsinn beeinflusst (Haupt and Huber, 2008). Im Tierreich findet die einfachste visuelle Wahrnehmung durch sogenannte Photorezeptoren statt, auf der Oberfläche des Organismus verstreut liegende Lichtsinneszelle, die eintreffende Lichtphotonen in elektrische Reize umwandeln. Diesen diffusen Lichtsinn findet man bei vielen Arten von Schwämmen, Trematoden und sessilen Mollusken. Mit diesen Rezeptoren können die Organismen jedoch nur auf Helligkeitsunterschiede reagieren, eine Bildwahrnehmung ist nicht möglich. Erst durch die Entwicklung von spezialisierten Rezeptorflächen und optischen Abbildungsmechanismen konnte Bild-Sehen erreicht werden (Duke-Elder, 1971).

Die Erforschung von Struktur und Funktion des visuellen Systems des Säugers wurde besonders an Katzen und Affen durchgeführt da ihre Sehsysteme dem des Menschen sehr ähnlich sind. Anhand von elektrophysiologischen Studien an der Katze konnten so z. B. präzise Beschreibungen der Funktion von Photorezeptoren der Retina und von verschiedenen Neuronentypen im visuellen Kortex erfolgen (Hubel, 1963).

Die Informationsverarbeitung im visuellen Kortex setzt sich aus unterschiedlichen Prozessierungsschritten zusammen. Eintreffende Informationen aus dem Gesichtsfeld werden über eine Bottom-Up-Verarbeitung in den beteiligten subkortikalen und kortikalen Strukturen über aufsteigende Assoziationsbahnen weiterverarbeitet. Parallel dazu findet eine Top-Down-Verarbeitung statt, die Erinnerungen, Wissen und Vorstellungen in die Prozessierung der eintreffenden Informationen integriert (Buschman and Miller, 2007). Diese Integration über die aufsteigenden (feed-forward) und absteigenden (feed-back) Assoziationsbahnen führt die Informationen der einzelnen Gehirnareale zusammen. Die primären Areale erfahren durch die Feedback-Schleifen, wie sich die von ihnen initiierten Veränderungen auf den Rest des Gehirns ausgewirkt haben und so können dann künftige Aktivitäten des Ursprungsortes den Auswirkungen auf andere Regionen entsprechend angepasst werden.

Untersuchungen des Feedbacks im visuellen Kortex der Katze konnten in Deaktivierungsstudien der MS-Region, die an der Analyse von Bewegungen und

Bewegungsrichtung beteiligt ist, direkte Einflüsse von Feedback-Projektionen auf die Antworteigenschaften der Neurone mittels optischer und elektrophysiologischer Ableitmethoden innerhalb der funktionellen Orientierungs- und Richtungskarten in Area 18 zeigen. Es stellte sich heraus, dass Feedback-Signale vom pMS Sulcus einen starken Einfluss auf die Richtungsselektivität im primären visuellen Kortex haben (Galuske et al., 2002). Nachdem nun physiologische Einflüsse des Feedbacks der MS-Region bekannt sind, soll in der vorliegenden Studie im nächsten Schritt eine anatomische Beschreibung dieser Strukturen erfolgen. Eine detailgenaue Beschreibung der Terminationsfelder der rückprojizierende Axone aus der MS-Region in den primären visuellen Kortex ist bis jetzt nicht vorhanden.

## 2.1 AUFBAU DES VISUELLEN SYSTEMS DER KATZE

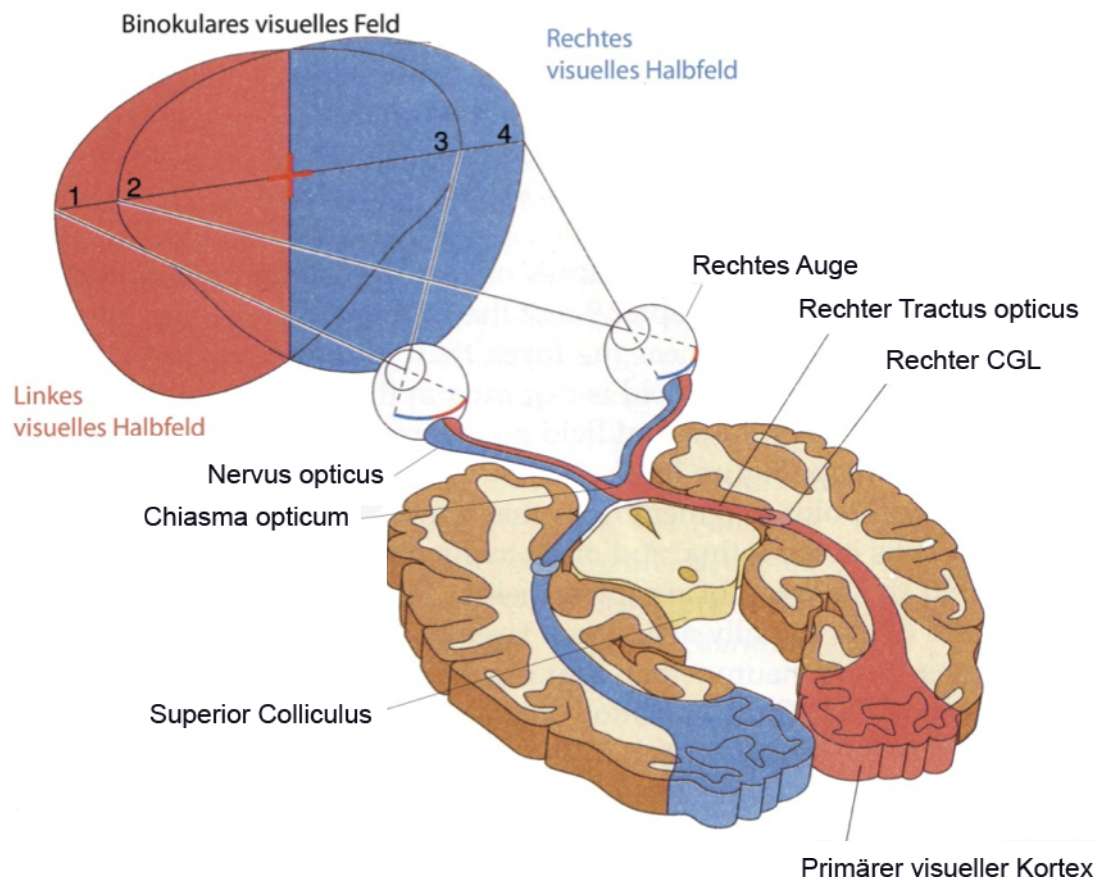
Das visuelle System der Katze dient als Untersuchungsobjekt und sein anatomischer Aufbau und seine funktionelle Organisation werden nun einleitend erklärt.

### 2.1.1 VOM AUGE ZUM KORTEx

Die Verarbeitung von visuellen Informationen beginnt mit dem Eintreffen von Licht in Form von elektromagnetischen Wellen auf die Rezeptorzellen in der Retina. Die Rezeptorzellen unterteilen sich in Stäbchen und Zapfen und wandeln das eintreffende Licht in elektrische Membranpotenziale um. Diese Membranpotenziale werden über Synapsen an Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen weitergeleitet, lateral zur Kontrastverstärkung verschaltet und in der letzten Stufe der Verarbeitung an die Ganglienzellen übertragen (Wassle, 2004).

Bei der Katze werden drei unterschiedliche Typen von Ganglienzellen anhand ihrer Antworteigenschaften unterschieden. Die Ganglienzellen vom Y-Typ antworten phasisch, besitzen große rezeptive Felder und verfügen somit über eine schlechte räumliche Auflösung. Sie sind nicht farbsensitiv, reagieren aber sehr empfindlich auf bewegte Reize. Die Ganglienzellen vom X-Typ weisen im Gegensatz dazu durch kleine rezeptive Felder eine hohe räumliche Auflösung auf. Sie antworten tonisch auf langsame statische Stimuli und dienen somit der Farb-, Muster- und Detailanalyse. Die dritte Gruppe bilden die W-Zellen, diese antworten sowohl phasisch als auch tonisch auf helle und dunkle Lichtpunkte und besitzen eine wesentlich niedrigere Leitungsgeschwindigkeit als die anderen Typen von Ganglienzellen (Cleland et al., 1975). Die Axone aller Ganglienzellen eines Auges bündeln sich zum Nervus opticus und verlassen im Bereich des blinden Flecks das Auge. Im Chiasma opticum kommt es zu einer partiellen Kreuzung der Fasern des rechten und des linken optischen Nervs. Die Fasern, die ihren Ursprung im nasalen Bereich der Retina haben, kreuzen in die kontralaterale Gehirnhemisphäre und die Fasern, die im temporalen Bereich ihren Ursprung haben, kreuzen nicht im Chiasma sondern ziehen in die ipsilaterale

Gehirnhemisphäre. Durch dieses Kreuzungsverhalten werden die Informationen des rechten Gesichtsfeldes nur in der linken Gehirnhemisphäre und die Informationen des linken Gesichtsfeldes nur in der rechten Gehirnhemisphäre verarbeitet (Abb. 2.1).



**Abbildung 2.1:** Darstellung der retinogenikulokortikalen Bahn. Die Wahrnehmung der Felder 1 bis 4 des visuellen Feldes erfolgt mit unterschiedlichen Bereichen der Retina des rechten und des linken Auges. Das linke Auge nimmt die Bereiche 1 bis 3 wahr (Bereich 1 und 2 von der nasalen Retina und Bereich 3 von der temporalen Retina) und das rechte Auge die Bereiche 2 bis 4 (Bereich 2 von der temporalen Retina und Bereiche 3 und 4 von der nasalen Retina). Die Überlappung der Sichtfelder beider Augen bildet das binokulare visuelle Feld (Bereiche 2 und 3). Durch die kontralaterale Kreuzung der Fasern aus der nasalen Retina und dem ipsilateralen Verlauf der Fasern aus der temporalen Retina wird die aufgenommene Information aus dem rechten visuellen Halbfeld komplett in der linken Gehirnhemisphäre verarbeitet (blau) und das linke visuelle Halbfeld komplett in der rechten Gehirnhemisphäre (rot). Nach der Kreuzung der Fasern im Chiasma opticum ziehen die Fasern über den Tractus opticus zum ipsilateral liegenden Corpus geniculatum laterale (CGL) und schließlich in den primären visuellen Kortex (modifiziert nach (Bear et al., 2006)).

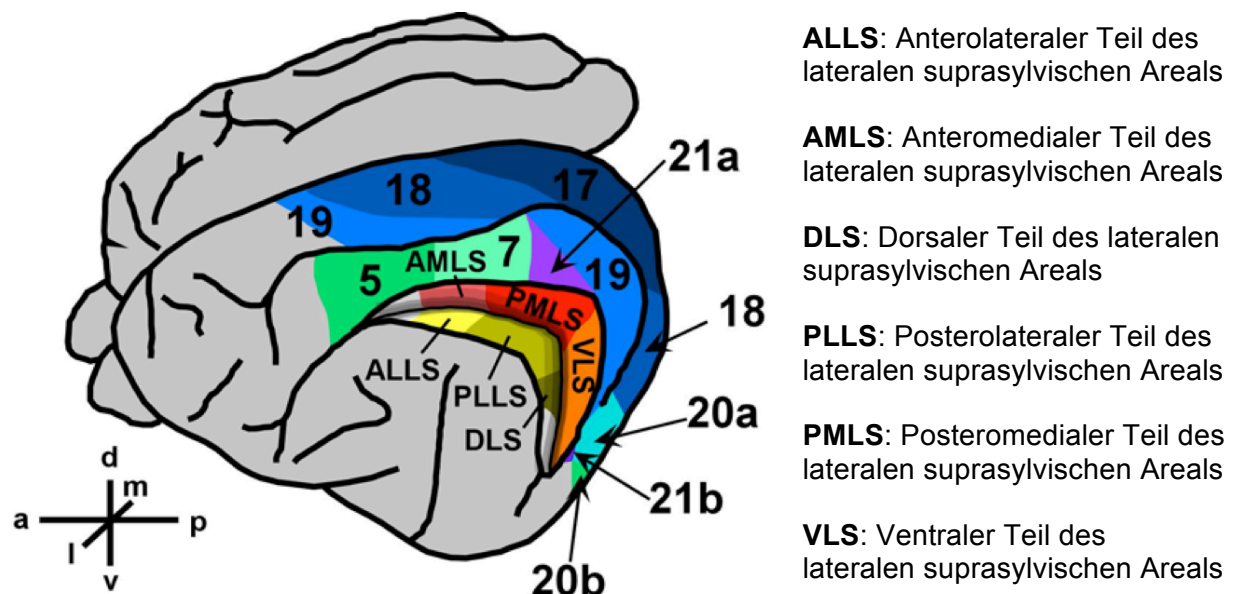
Nach der Kreuzung im Chiasma opticum bilden die Fasern den Tractus opticus und leiten und verteilen die Information an das Corpus geniculatum laterale (CGL), einen Thalamuskern weiter. Dieser ist Teil des dorsalen Thalamus und stellt eine der wichtigsten subkortikale Schaltstation der Sehbahn neben dem Superior Colliculus dar. Der CGL bildet den sensorischen Eingang für den primären visuellen Kortex.

Der CGL besteht aus drei Hauptschichten (Abb.4.10), die von dorsal nach ventral folgende Bezeichnungen tragen: A, A<sub>1</sub> und B. Angrenzend befinden sich der Nucleus interlaminaris medialis (NIM) und der Pars ventralis (V) (O'Leary, 1940, Hayhow, 1958). Die Ganglienzellen vom X-Typ kodieren die Information über Farbe, Form und Detail über die parvozellulären Schichten (A und A<sub>1</sub>) des CGL zum primären visuellen Kortex. Parallel zu dieser Verarbeitung geben die Y-Zellen die Information über Bewegung und Tiefe über die magnozelluläre Schicht (B) weiter (Stone and Hansen, 1966, Westland and Burke, 2002). Die Antworteigenschaften der Neurone im CGL entsprechen denen der vorgeschalteten Ganglienzellen. Nach der Verschaltung im CGL wird die Information der X-Zellen vorwiegend zu Area 17 weitergeleitet und die der Y-Zellen zu Area 18 (Gilbert and Kelly, 1975).

Im CGL, im primären visuellen Kortex und in weiteren Arealen, die an der weiteren Verarbeitung der visuellen Informationen beteiligt sind, kommt es zur Beibehaltung der Nachbarschaftsbeziehungen aus der Netzhaut. So entsteht eine topographische Abbildung der Netzhaut in den beteiligten Strukturen (Retinotopie) im visuellen Kortex (Tusa et al., 1978, Tusa et al., 1979, Tusa and Palmer, 1980, Updyke, 1986).

### 2.1.2 DER VISUELLE KORTEX DER KATZE

Anhand der zytoarchitektonischen Eigenschaften lässt sich der visuelle Kortex der Katze in vermutlich 16 unterschiedliche Areale unterteilen (Abb.2.2) (Sanides and Hoffmann, 1969). Für die vorliegende Studie sind die Areale des primären visuellen Kortex, Area 17 und Area 18, und die Areale innerhalb des suprasylvischen Sulcus von Interesse.



**Abbildung 2.2:** Lateralansicht der linken Hemisphäre eines Katzenschädelns. Die verschiedenen Kortexareale sind farblich markiert, der primäre visuelle Kortex ist in blau dargestellt. Der suprasylvische Sulcus beinhaltet die Areale AMLS, PMLS, VLS, ALLS, PLLS und DLS (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral, d: dorsal, v: ventral, nach Galuske et al., 2002).

Der primäre visuelle Kortex der Katze gliedert sich aufgrund einer vorhandenen Parallelverarbeitung der eintreffenden Signale aus dem CGL in zwei Areale: Area striata (17) und Area occipitalis (18) (Tretter et al., 1975). Die Areale befinden sich aneinander angrenzend auf dem Sulcus calcarinus und können sehr gut anhand ihres zytoarchitektonischen Aufbaus unterschieden werden (Kap. 3.4.2.6). Ein funktioneller Unterschied zwischen den Arealen besteht in der Größe ihrer rezeptiven Felder: Area 18 besitzt größere rezeptive Felder als Area 17. Ein gemeinsames grundlegendes Charakteristikum dieser Areale ist die kolumnäre Anordnung von Neuronen, die ähnliche Antworteigenschaften auf bestimmte Stimuli haben (Hubel and Wiesel, 1974, Mountcastle, 1997). Die Orientierungsselektivität von Neuronen wird durch die Konzentration von genikulokortikalen Signalen auf Neurone in Schicht IV (Hubel and Wiesel, 1962, Mignard and Malpeli, 1991, Reid and Alonso, 1996) und über die Verstärkung innerhalb der lokalen Netzwerke hervorgerufen (Eysel et al., 1988, Somers et al., 1998). Neurone, die in kortikalen Kolumnen angeordnet sind, haben gleiche Orientierungspräferenzen, was darauf zurück zu führen ist, dass die vorhandene funktionelle Eigenschaft zu den Neuronen in den infra- und supragranulären Schichten weitergeleitet wird.

Die Rindenbereiche im suprasylvischen Sulcus sind an der Analyse von Bewegungen und Bewegungsrichtungen beteiligt und untergliedern sich in 6 Areale: AMLS (anterolateraler Teil des lateralen suprasylvischen Areals), PMLS (posteromedialer Teil des lateralen suprasylvischen Areals), VLS (ventraler Teil des laterales suprasylvischen Areals), ALLS (anterolateraler Teil des lateralen suprasylvischen Areals), PLLS (posterolateraler Teil des lateralen suprasylvischen Areals) und DLS (dorsaler Teil des lateralen suprasylvischen Areals) (Abb.2.2).

## 2.2 FUNKTIONELLE ORGANISATION DES VISUELLEN KORTEX DER KATZE

Nach der Darstellung der anatomischen Organisation der einzelnen Areale des visuellen Kortex werden nun grundlegende Verbindungen zwischen den Arealen und den verschiedenen Stufen der Verarbeitung dargestellt.

Innerhalb des Neokortex werden zwei Gruppen von kortikalen Verbindungen unterschieden: die intrinsischen und die extrinsischen Verbindungen. Unter intrinsischen Verbindungen versteht man Projektionen von Neuronen, deren Axonterminalien im gleichen Areal verbleiben wie der Ausgangszellkörper und nicht in die weiße Substanz ziehen. Unter dem Begriff der extrinsischen Verbindungen werden Projektionen zusammengefasst, die Neurone miteinander verknüpfen, die sich in räumlich voneinander getrennten Arealen befinden. Wenn zwei Areale verbunden werden, die sich in der gleichen Hemisphäre befinden, spricht man von intrahemisphärischen Verbindungen. Wenn sich die Areale in

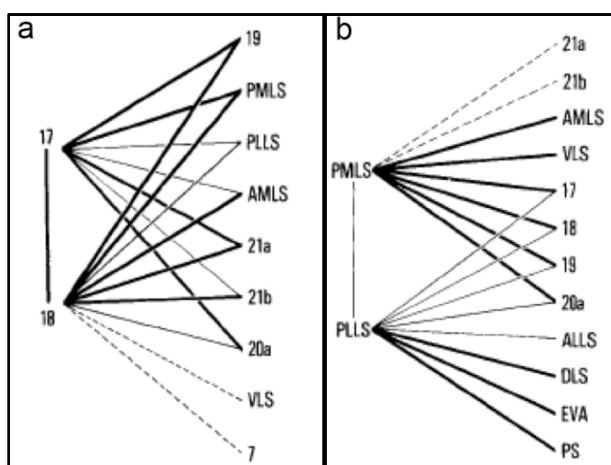


verschiedenen Hemisphären befinden, spricht man von interhemisphärischen Verbindungen (Salin and Bullier, 1995).

### 2.2.1 VERBINDUNGEN ZWISCHEN DEN AREALEN DES VISUELLEN KORTEX

Um die Verbindungen zwischen den Arealen des visuellen Kortex zu untersuchen, wurden in einer Studie von Symonds und Rosenquist (Symonds and Rosenquist, 1984) die anatomischen Tracer  $^3\text{H}$ -Leucin und Meerrettichperoxidase (HRP) in alle beteiligten Areale injiziert und ihre Projektionen analysiert. Aus den erhaltenen Ergebnissen konnten sie folgenden Prinzipien ableiten: alle kortikokortikalen Verbindungen sind reziprok, jedes Areal hat sein eigenes Verbindungsmuster, es gibt viele parallele Verbindungskreisläufe, retinotopie Bereiche zweier Areale werden unter Beibehaltung dieser Retinotopie miteinander verbunden und die Verbindungen zwischen den visuellen Arealen entspringen und/oder terminieren in ungleichmäßig verteilten Patches (Zellansammlungen, die sich anhand der Färbung deutlich vom ungefärbten Bereichen innerhalb des kortikalen Netzwerks räumlich abgrenzen).

Bei der Betrachtung der Verbindungsmuster lassen sich Area 17 und Area 18 gemeinsam betrachten, da sie sehr ähnliche reziproke Muster aufweisen (Abb. 2.3a). Area 17 und 18 sind miteinander verbunden und weisen starke Verbindungen mit den Arealen 19, PMLS, PLLS, AMLS, 21a, 21b und 20a auf. Area 18 ist zusätzlich mit Area 7 und VLS schwach verbunden. Die benachbarten Areale PMLS und PLLS sind miteinander nur schwach verbunden, zeigen aber beide Verknüpfungen zu den Arealen 17, 18, 19 und 20a, wobei diese von PLLS ausgehend nur schwach ausgeprägt sind. PMLS hat ergänzend weitere starke Verbindungen zu VLS und AMLS, sowie mögliche Verbindungen zu Area 21 a und 21b. PLLS hat starke Verbindungen mit DLS, EVA (ectosylvanisches optisches Areal) und PS (posteriorer Teil des suprasylvanischen Sulcus) (Abb. 2.3b).

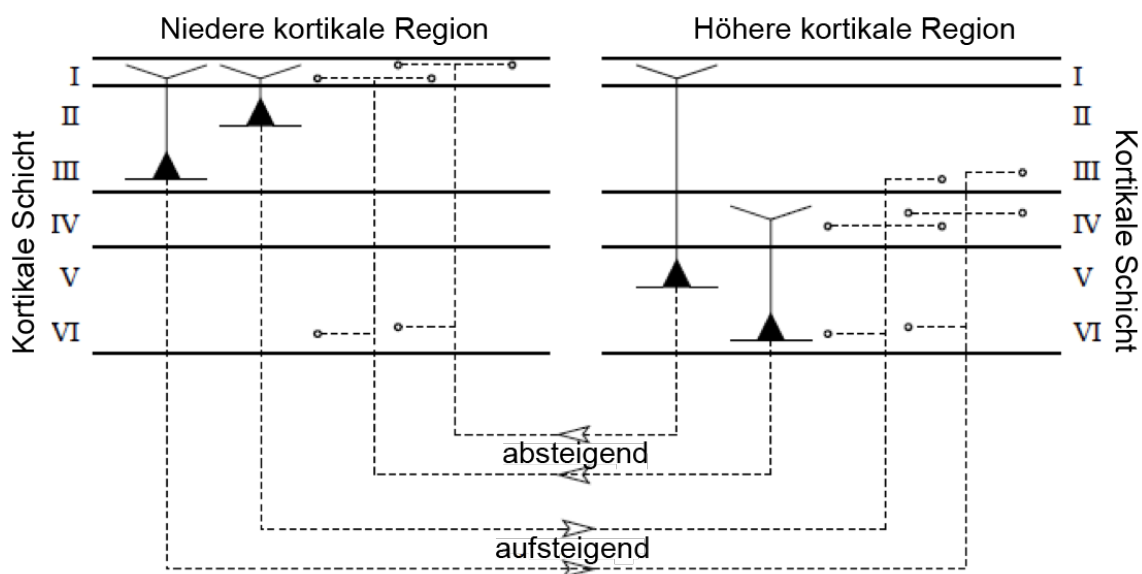


**Abbildung 2.3:** Übersicht über die reziproken kortikokortikalen Verbindungen der Areale (a) 17 und 18, (b) PMLS und PLLS. Die dicken Linien zeigen starke Verbindungen zwischen den Arealen an, die dünnen Linien zeigen schwache Verbindungen an und die gestrichelten Linien deuten mögliche Verbindungen an (Symonds and Rosenquist, 1984).

### 2.2.2 HIERARCHISCHE ORGANISATION

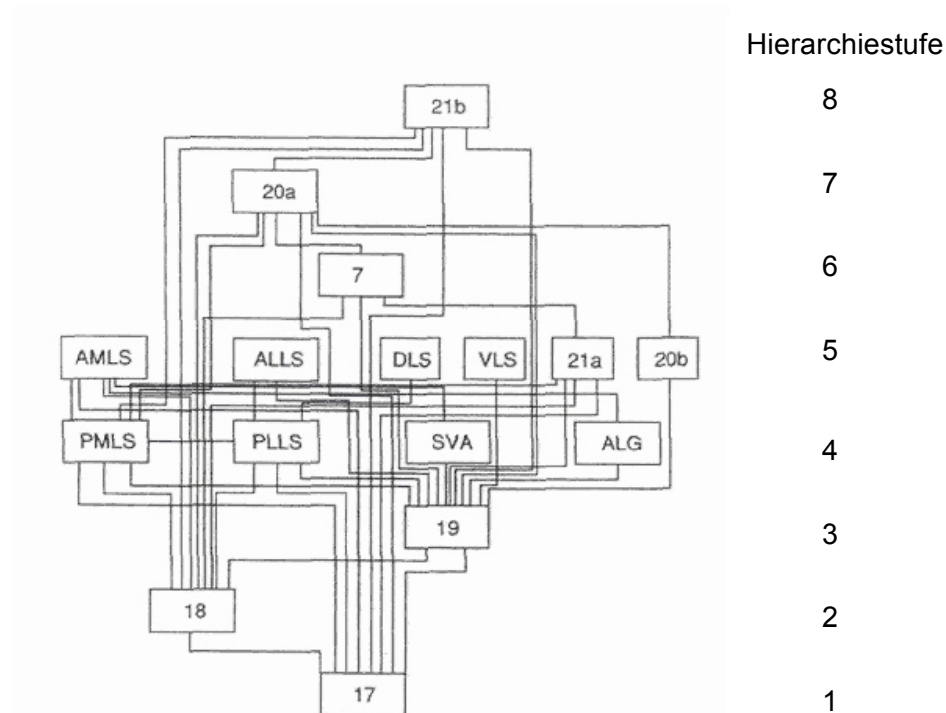
Für die genauere Beschreibung der Verbindungsmuster zwischen den Arealen des visuellen Kortex wird im Folgenden die laminare Organisation der Terminationsbereiche der

Projektionen betrachtet (Abb. 2.4). Die aufsteigenden Bahnen aus dem CGL projizieren über ihre Axone auf Neurone in und um Schicht IV. Alle Schichten innerhalb eines Areales sind über laterale und vertikale intrinsische Verbindungen miteinander verknüpft. Die Schichten II und III bilden den Ausgangspunkt für aufsteigende (feed-forward) Projektionen in höhere Kortexareale, die dort in den Schichten III, IV und VI terminieren. Die Rückprojektionen (Feedback) aus den höheren Arealen bestehen aus Axonen von Pyramidenzellen, die sich in den Schichten V und VI befinden. Sie projizieren hauptsächlich zurück in die Schichten I und VI des in der Hierarchie niedrigeren Areals. In Schicht I befinden sich die Apikaldendriten von Pyramidenzellen aus den Schichten II, III und V. Schicht V projiziert nun wiederum die eintreffenden Rückprojektionen weiter in die Schichten II bis IV, Schicht VI projiziert zurück in die Eingangsschicht IV (Spratling, 2002). Eine dritte Gruppe von Projektionen bilden die lateralen Projektionen. Sie verbinden Areale, die sich auf der gleichen Hierarchieebene befinden, aber unterschiedliche funktionelle Aufgaben haben. Die Projektionen werden von Neuronen entsendet, die sich in den Schichten II, III, V und VI befinden und ihre Terminationen kommen in allen Schichten des verknüpften Areals zu liegen (Felleman and Van Essen, 1991). Durch alle Typen von Verbindungen zwischen den kortikalen Schichten und den verschiedenen Arealen entsteht ein kompliziertes Netzwerk, welche eine eingehende funktionelle Untersuchung nur indirekt zulässt.



**Abbildung 2.4:** Hierarchische Informationsweitergabe von einem primären zu einem sekundären Areal, dargestellt über die Verbindungsmuster der einzelnen kortikalen Schichten. Die Pyramidenzellen sind als ausgefüllte Dreiecke dargestellt, ihre Dendriten als schwarze Linien und ihre Axone als gestrichelte Linien. Die Bahnen vom primären zum sekundären Areal werden als aufsteigenden Verbindungen (feed-forward) und die Bahnen vom sekundären zu primären Areal als absteigende Verbindungen (Feedback) bezeichnet (modifiziert nach Spratling, 2002).

Anhand der Untersuchungen der feed-forward, feed-back und lateralen Konnektivitäten zwischen seinen 16 Arealen konnte der visuelle Kortex der Katze in 8 Hierarchiestufen der Verarbeitung eingeteilt werden (Abb. 2.5). Die ersten drei untersten Stufen bilden Area 17, Area 18 und Area 19, die ihre Eingänge direkt von subkortikalen Strukturen (z. B. CGL) erhalten. Die vierte Stufe bilden die Areale PLLS, PMLS, SVA und ALG und die fünfte Stufe besteht aus den Arealen AMLS, ALLS, DLS, VLS, 21a und 20b. Die oberen Stufen sechs, sieben und acht bestehen jeweils nur aus einem beteiligten Areal (Area 7, Area 20a und Area 21b) (Felleman and Van Essen, 1991).



**Abbildung 2.5:** Darstellung der 16 Areale, die an der visuellen Signalverarbeitung beteiligt sind in Abhängigkeit ihrer Hierarchiestufe. Es sind insgesamt 62 Verbindungen und 8 Verarbeitungsstufen vorhanden. Die vierte und fünfte Stufe enthalten sehr viele Areale im Vergleich zu den anderen Stufen, die nur von einem Areal gebildet werden (Felleman and Van Essen, 1991).

Die hierarchische Anordnung der Areale anhand ihrer Konnektivitäten lässt kaum Rückschlüsse auf die funktionellen Eigenschaften der Areale zu. Die Feedback-Projektionen und die zahlreichen Interaktionen mit subkortikalen Strukturen führen zu einer komplizierten Verbindung zwischen den strukturellen hierarchisch organisierten Aspekten und den funktionellen Eigenschaften des Netzwerks (Hilgetag et al., 2000).

### 2.2.3 FUNKTIONELLER AUFBAU DES VISUELLEN KORTEX

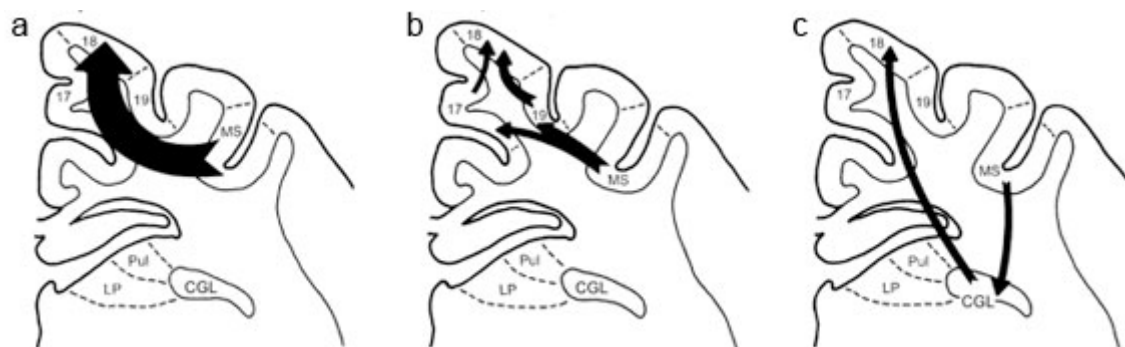
Nach der Umschaltung der eintreffenden Signale der retinalen Ganglienzellen im CGL, werden die Signale an den primären visuellen Kortex (Area 17 und Area 18) weitergeleitet. Die bis zu diesem Punkt parallele Verarbeitung der verschiedenen Signale, trennt sich nachfolgend in zwei Bahnen auf: die WAS-Bahn, die für die Farb-, Form- und



Wie Feedback-Projektionen des suprasylvischen Sulcus die Verarbeitung von Bewegungen im primären visuellen Kortex beeinflussen, soll im Weiteren von anatomischer und physiologischer Sicht betrachtet werden.

## 2.3 EINFLUSS VON FEEDBACK-VERBINDUNGEN

Die gefundenen Feedback-Projektionen von der MS-Region zu Area 18 wurden in der Studie von Symonds und Rosenquist als sehr stark ausgeprägt beschrieben (Symonds and Rosenquist, 1984). Eine weitere Quantifizierung war in ihrer Arbeit jedoch nicht möglich. In einer Studie von Payne und Lomber erfolgte eine genauere Betrachtung der Verbindungen zwischen der MS-Region und Area 18 (Payne and Lomber, 2003). Es zeigte sich, dass 26% der Eingänge in Area 18 ihren Ursprung in der MS-Region hatten und anhand ihrer laminaren Verteilung als Rückprojektionen angesehen werden konnten. Ergänzend konnten weitere Rückprojektionswege dargestellt werden. Ein geringerer Anteil der Feedback-Verbindungen projiziert zuerst auf Area 17 und Area 19, die dann wiederum ihr Feedback an Area 18 weitergeben. Es wurden weiterhin thalamische Rückprojektionen gefunden, die über den CGL zu Area 18 projizieren (Abb. 2.7).



**Abbildung 2.7:** Darstellung der Feedback-Projektionen von der medialen Bank des suprasylvischen Sulcus (MS-Region) zu Area 18 anhand eines schematischen Koronarschnittes. Es bestehen direkte Verbindungen zwischen den beiden Bereichen (a), Verbindungen, die über Area 17 und Area 19 zu Area 18 projizieren (b) und es sind Verbindungen über den CGL vorhanden (c). Die Breite der Verbindungspfeile verdeutlicht die relative Anzahl der vorhandenen Rückprojektionen (modifiziert nach Payne und Lomber, 2003).

Funktionelle Aussagen über die Einflüsse von Feedback-Projektionen lassen sich auf unterschiedlichen Ebenen treffen. So zeigte sich z. B. in Einzelzelleableitungen, dass Neurone im primären visuellen Kortex von Feedback-Signalen aus in der Verarbeitungshierarchie höher gelegenen Arealen beeinflusst werden (Hupe et al., 1998, Hupe et al., 2001). In Deaktivierungsstudien der MS-Region konnten direkte Einflüsse der Feedback-Projektionen auf die Antworteigenschaften der Neurone mittels optischer und elektrophysiologischer Ableitmethoden innerhalb der funktionellen Orientierungs- und Richtungskarten in Area 18 untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Deaktivierung des Feedbacks die Signalstärke in den Orientierungs- und Richtungskarten verringerte und die Organisation von

Richtungskarten massiv veränderte. Diese Effekte lassen sich durch eine selektive Unterdrückung der Antworten von richtungsselektiven Neuronen und eine damit verbundene Neuausrichtung der Präferenzen von weniger selektiven Neuronen erklären. Somit wurde gezeigt, dass das Feedback vom pMS Sulcus einen starken Einfluss auf die Richtungsselektivität im primären visuellen Kortex hat (Galuske et al., 2002).

Eine anatomische Beschreibung der funktionell-topographischen Organisation der Feedback-Verbindungen von PMLS nach Area 18 auf kolumnären Ebene fehlt bislang. Zum besseren Verständnis der oben beschriebenen physiologischen Effekte ist jedoch eine detailgenaue Analyse der Terminationsfelder der rückprojizierenden Axone im primären visuellen Kortex unabdingbar.

## 2.4 ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung der Verbindungsmuster zwischen PMLS und dem primären visuellen Kortex. Durch die Entwicklung von neuartigen anatomischen Tracern, wie z.B. der Dextranamine, die in ihren Laufeigenschaften innerhalb der Neurone in unterschiedlichen Spezies sehr gut beschrieben wurden, wurde eine genauere Untersuchung dieser Projektionen ermöglicht.

Durch die Verwendung von fluoreszenz-markierten Dextranen soll im ersten Teil der Studie die genaue laminare Herkunft der Feedback-Projektionen von PMLS nach Area 18 durch Injektion in funktionell charakterisierte Bereiche von Area 18 untersucht werden. Im zweiten Teil der Studie werden biotinylierte Dextranamine verwendet, die eine Golgi-ähnliche Darstellung der markierten Neurone und ihrer Axone ermöglichen. Nach erfolgreicher Rekonstruktion der Axone von PMLS zum primären visuellen Kortex sollen die Daten mit funktionellen Karten der Terminationsregion zur Deckung gebracht werden, die parallel dazu durch Optical Imaging des intrinsischen Signals erstellt worden sind. Auf diese Weise können dann die Terminationsmuster von Feedback-Axonen exakt und quantitativ in ihrer Topographie beschrieben und funktionell charakterisiert werden.

### 3 METHODEN

Die durchgeführten Untersuchungen gliedern sich in zwei Hauptversuche. Für beide Versuche werden die verwendeten Versuchstiere (Kap. 3.1) und vorbereitenden Maßnahmen, wie Anästhesie und Medikation der Versuchstiere vor, während und nach den chirurgischen Eingriffen in Kap. 3.2.1 und 3.2.2 dargestellt. Nach Abschluss dieser Maßnahmen erfolgte im ersten Versuch für die Untersuchung der laminaren Herkunft der Feedback-Projektionen von PMLS nach Area 18 die optische Ableitung in Area 18 (Kap. 3.2.3) und sowie die Analyse der erhaltenen Daten (Kap. 3.4.1). Anschließend wurden für die Studie interessante Bereiche innerhalb der funktionellen Karten ausgewählt und die Tracerinjektionen von Dextran gekoppelt mit Fluorescein und Tetramethylrhodamin durchgeführt (Kap. 3.2.4.5). Das Versuchstier wurde nach Einhaltung der nötigen intrazellulären Laufzeit des Tracers von 7 Tagen euthanasiert und für die Fixierung des Gewebes perfundiert (Kap. 3.2.5). Für die Auswertung wurde das Gewebe histologisch aufgearbeitet (Kap. 3.3 und 3.4).

Im zweiten Hauptversuch erfolgten nach den gleichen vorbereitenden Maßnahmen und chirurgischen Eingriffen wie im ersten Versuch, eine PMS-Kraniotomie (Abb. 3.1) und die Injektion von biotinylierten Dextranaminen (Kap. 3.2.4.4). Nach der siebentägigen Laufzeit des Tracers wurde das Versuchstier erneut narkotisiert, eine optische Ableitung in Area 18 durchgeführt und für die spätere Überlagerung der funktionellen Karten mit den rekonstruierten Axonen Referenzelektroden in das Gewebe eingeführt (Kap. 3.2.4.4). Anschließend erfolgten die Euthanasie der Katze und die Perfusion zur Gewebefixierung. Das erhaltene Gewebe wurde ebenfalls histologisch aufbereitet und die Gewebeschnitte für die Rekonstruktion von Axonen von PMLS zum primären visuellen Kortex verwendet. Für das bessere Verständnis der einzelnen Versuchsabschnitte werden diese nicht nach Versuchsansatz sondern nach angewandeter Methode im Folgenden getrennt darstellt.

#### 3.1 VERSUCHSTIERE

Für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten wissenschaftlichen Untersuchungen wurden 5 adulte Katzen als Versuchstiere aus der Zucht des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung in Frankfurt am Main bezogen. Das Alter der Versuchstiere lag zwischen 2 und 3 Jahren, ihr Gewicht zwischen 3 und 5 kg. Eine Übersicht befindet sich im Anhang.

Die durchgeführten chirurgischen Eingriffe wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsverfahrens und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

## 3.2 VERSUCHSAUFBAU UND DURCHFÜHRUNG

Im Folgenden wird der Ablauf des experimentellen Aufbaus der durchgeführten Tierversuche ausführlich dargestellt.

### 3.2.1 ANÄSTHESIE UND MEDIKAMENTATION

Die initiale Anästhesie wurde dem nüchternen Versuchstier durch eine intramuskuläre Injektion einer Mischung aus dem Kurzzeitanästhetikum Ketamin (Ketaminhydrochlorid 10 mg/kg, Bela-Pharma GmbH & Co. KG, Vechta) und dem Neuroleptikum Rompun (Xylazinhydrochlorid 0,1 mg/kg, BayerVital, Leverkusen) verabreicht. Zusätzlich wurde das Parasympatholytikum Atropin (Atropinsulfat 0,1 mg/kg, Braun, Melsungen) intramuskulär appliziert um den Kreislauf der Katze zu stabilisieren. Sobald die Narkose ihre Wirkung zeigte, erfolgte die Intubation. Hierzu wurde vorbereitend der Rachenraum mit Lidocain-Spray (Xylocain, Astra Zeneca GmbH, Wedel) lokal betäubt und der Intratrachealtubus mit einem Lidocain-Gel (Xylocain, Astra Zeneca GmbH, Wedel) bestrichen. Nach erfolgreicher Intubation wurde um die Narkose inhalativ durch Beatmung mit einer Mischung aus Sauerstoff und Lachgas (30% O<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>O) mit 1,2% Halothan (Halocarbon Laboratories, River Edge, New Jersey) weitergeführt. Die Atmung wurde während der Eingriffe über die Messung der Atemgase mittels eines Oxymeter/Capnometers (Smart Anesthesia Multi-Gas (SAM) Modul Dash 3000, Milwaukee, USA) überwacht. Die Atemfrequenz wurde dabei so eingestellt, dass die expiratorische CO<sub>2</sub>-Konzentration zwischen 2,5% und 3,5% lag (circa 10-20 Atemzyklen pro Minute). Die Vitalfunktionen der Katze, wie Atemdruck, Körpertemperatur und Elektrokardiogramm wurden über die gesamte Dauer der operativen Eingriffe überwacht. Zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes während des Experiments wurde über einen Venenkatheter mit einem Perfusor (Perfusor VI, B. Braun, Melsungen AG) in einer Rate von 3 ml/h isotonische Kochsalzlösung (0,9%, B. Braun Melsungen AG) zugeführt. Zur Konstanzhaltung des Glukosespiegels und der Elektrolytversorgung wurden in Abständen von 2 bis 3 Stunden Injektionen von Glukose (10% Glukose-Lösung, B. Braun Melsungen AG) und Tutofusin (Baxter, Deutschland) verabreicht. Durch die Flüssigkeitszufuhr war es in regelmäßigen Abständen notwendig, eine manuelle Entleerung der Blase durchzuführen. Bevor mit den operativen Eingriffen begonnen wurde, wurde Dexamethason (1 mg/kg Voren, Boeringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim) intravenös verabreicht. Dexamethason wirkt vorbeugend gegenüber Hirn-Ödemen. Weiterhin wurde vor Beginn der visuellen Stimulation und Aufnahme der Optical Imaging Daten durch die intravenöse Gabe von Pancuronium (Pancuroniumbromid 0,8 mg/ml) eine Muskelrelaxation hervorgerufen, um Augenbewegungen zu vermeiden. Die Halothanzufuhr wurde von 1,2% auf 0,6% gesenkt. Nach Beendigung des ersten Teils der experimentellen Versuche (Ableitung, Tracerinjektion und optional Optical Imaging) wurde zur Ausleitung der Narkose die Zufuhr von Halothan und Lachgas eingestellt und nur noch mit reinem



Sauerstoff beatmet. Kurz vor dem Aufwachen wurden der Katze zur postoperativen Schmerztherapie Rimadyl (Carprofen 5 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe) verabreicht. Eine antibiotische Therapie erfolgte durch Gabe von Convenia (Cefovecin 0,8 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe), Veracin (Benzylpenicillin-Benzathin 0,1 mg/kg, A. Albrecht, Aulendorf) und Paraxin (Chloramphenicol 0,2 mg/kg, Roche, Mannheim) injiziert. Die Katze wurde 7 Tage postoperativ schmerzlindernd und antibiotisch behandelt. Zusätzlich wurde die Glucosteroidtherapie langsam ausgeschlichen. Dabei wurden die Medikamente Voren (Tag 1 bis 3), Rimadyl (Tag 1 und 2), Veracin (Tag 1, 4, 6), Convenia (Tag 1), Veracin (Tag 1, 4, 6) und Paraxin (Tag 1, 3, 5, 6) verabreicht. Am siebten Tag erfolgte die erneute Anästhesie und präoperative Vorbereitung der Katze mit dem eingangs beschriebenen Ablauf und für Katze 4 erfolgte die Erfassung der Optical Imaging Daten mit der damit einhergehenden Medikation. Abschließend erfolgte die Gabe von einer Überdosis von Narcoren (Pentobarbital 200 mg/kg, Veterinaria AG, Zürich) der den Herzstillstand der Katze zur Folge hat. Die Katze wurde im direkten Anschluss transkardial perfundiert (Kap. 3.2.5). Eine genaue Beschreibung der Dosierung und der Wirkungsweisen der verwendeten Medikamente befindet sich im Anhang (Kap. 8.6).

### 3.2.2 CHIRURGISCHE EINGRIFFE

Nachdem die Wirkung der Initialnarkose einsetzte und die Beatmung sichergestellt war, wurde das Versuchstier in einem Stereotaxierahmen zentral fixiert. Diese Fixierung erfolgt mittels zwei Jochbeinhaltern, zwei Ohrstiften und einem Kieferhalter. Dies wurde für die spätere Bestimmung der genauen stereotaktischen Koordinaten für die bevorstehenden Kraniotomien benötigt.

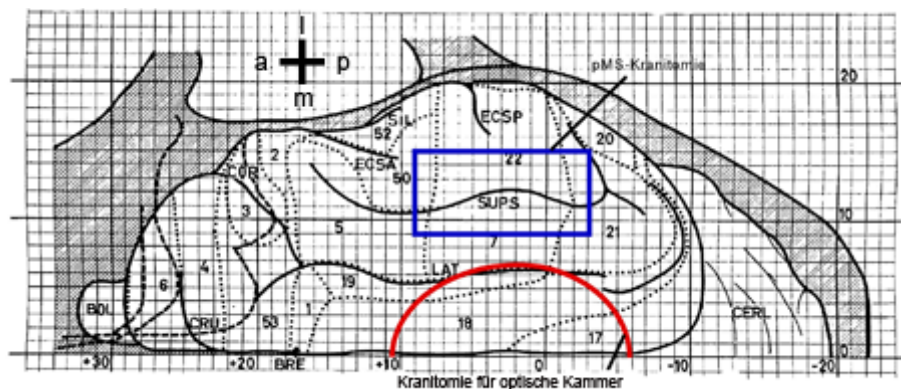
#### 3.2.2.1.1 Kraniotomie

Als Vorbereitung für die Kraniotomie wurde der Schädel des Versuchstiers rasiert und die betreffenden Hautbereiche desinfiziert. Alle weiteren Eingriffe fanden unter sterilen Bedingungen statt. Es wurde ein Medianschnitt vom Hinterhauptsbein bis zur Stirn vorgenommen und die Kopfhaut mit Klemmen gespreizt. Freigelegte Muskelreste und Knochenhaut am Schädelknochen wurden mit einem Raspatorium entfernt. Die genauen Bereiche für die Kraniotomien im Bereich des primären visuellen Kortex und des pMS-Sulcus wurden anhand der stereotaktischen Koordinaten nach Horsley und Clarke unter Verwendung eines topographischen Atlases des Katzenhirns ermittelt (Reinonso-Suarez, 1961).

Um die genaue Position der Ableitkammer zu bestimmen, wurde der Nullpunkt der Raumachsen des Koordinatensystems ermittelt, indem eine Linie zwischen den Spitzen der beiden Ohrstifte gezogen wird. Für die Kraniotomie wurden im Folgenden ein Bereich von +2 mm auf der Anterior-Posterior-Achse als Mittelpunkt markiert. Für die Ableitkammer wurde daraufhin mit einem Durchmesser von 20 mm der Schädelknochen mit einem Bohrer (Moto-Flex, Dremel, USA) entfernt. Um die Kammer besser fixieren zu können, wurden 6

Schrauben um die Kraniotomie angebracht. Der Basisring der Ableitkammer konnte nun mit Dentalzement (Paladur, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau) auf dem Schädelknochen und an den Schrauben befestigt werden. Um die Dichtheit der Kammer zu gewährleisten, wurde diese von innen mit Modellierwachs abgedichtet. Zusätzlich wurde an den eingebrachten Schrauben eine Kopfhalterung befestigt, die im weiteren Verlauf des Eingriffs eine Entfernung der Ohrstifte und Jochbeinhalter ermöglichte. Als Vorbereitung für die optischen Ableitungen wurde die Dura mater über beiden Hemisphären innerhalb der Kammer entfernt. Zum Abschluss wurde die Kammer mit Silikonöl (DS Fluid, Boss Products) mit einer dynamischen Viskosität von 50 cs befüllt und mit einer eingepassten Glasplatte mit einer Dicke von 1 mm luftdicht verschlossen. Die Befüllung der Kammer minderte Bewegungen durch die im Herzschlag pulsierende Kortexoberfläche, welche sich störend auf die folgenden optischen Ableitungen ausgewirkt hätten.

Die Koordinaten der pMS-Kraniotomie wurden ebenfalls wie oben beschrieben bestimmt und die Öffnung des Schädels erfolgte im Bereich von +9 mm bis -3 mm auf der Anterior-Posterior-Achse und +9 mm bis +15 mm auf der Medial-Lateral-Achse (Abb. 3.1). Nach erfolgreichen Tracerinjektion in PMLS wurde das entfernte Knochenstück, welches in Ringer-Lösung gelagert wurde, wieder auf die Dura aufgesetzt und mit Knochenwachs und Zahnzement befestigt.



**Abbildung 3.1:** Dorsalansicht der rechten Gehirnhälfte der Katze. Die Kraniotomie für die optische Kammer ist in Rot dargestellt, sie befindet sich über dem primären visuellen Kortex (vorwiegend Area 18). Innerhalb dieser Kammer wurden ebenfalls die Tracerinjektionen in Area 18 vorgenommen. Die Kraniotomie für die Tracerinjektion in PMLS ist in Blau dargestellt, sie befindet sich über dem pMS-Sulcus (a= anterior, p= posterior, m= medial, l= lateral) (modifiziert nach Reinonso-Suarez, 1961).

### 3.2.3 OPTICAL IMAGING DES INTRINSISCHEN SIGNALS

Optical Imaging ist eine zweidimensionale optische Ableitmethode, die die Aktivität des Gehirns durch die Aufnahme von Veränderung in der Lichtabsorption in vivo sichtbar macht (Grinvald, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Veränderung der Sauerstoffsättigung von Hämoglobin in oxygenierter und deoxygenierter Form untersucht (Jobsis, 1977). Die Sauerstoffsättigung ändert sich bei neuronaler Aktivität durch den erhöhten Metabolismus

der Neurone, was eine Veränderung der Konzentrationen an deoxygeniertem und oxygeniertem Hämoglobin zur Folge hat. Dieses hämodynamische Signal kann bei einer Wellenlänge von 400 – 630 nm gemessen werden, jedoch liegt der prozentual größte Unterschied der Lichtabsorption zwischen Oxy- und Deoxyhämoglobin bei einer Wellenlänge von 605 nm. Das Deoxyhämoglobin absorbiert bei dieser Wellenlänge fünfmal mehr Licht als Oxyhämoglobin, jedoch liegen die aktivitätsabhängigen Änderungen der Absorptionseigenschaften bei einer Wellenlänge von 605 nm nur im Bereich von 0,1 - 0,2% im Verhältnis zur Gesamtmenge des reflektierten Lichts.

Anhand von Untersuchungen des intrinsischen Signals mittels Optical Imaging konnten in der Vergangenheit eine Vielzahl von funktionellen Strukturen, wie Retinotopie, Okulardominanz- und Orientierungskolumnen des visuellen Kortex in vivo dargestellt werden (Malach et al., 1994, Malonek et al., 1994, Hubener et al., 1997, Shoham et al., 1997, Das and Gilbert, 1999, Shoham and Grinvald, 2001).

Für die vorliegende Arbeit war die Methode notwendig, die funktionellen Eigenschaften von Area 18 im primären visuellen Kortex zu ermitteln, um weitere Informationen über die rekonstruierten Axone und ihre Terminationsfelder zu erhalten.

Die visuelle Stimulation und die Aufnahme der Optical Imaging Daten zur Erstellung der Orientierungskarten wurden je nach Versuchsansatz entweder vor der Tracerinjektion und/oder danach durchgeführt (Kap. 3.2.4).

### **3.2.3.1 Visuelle Stimulation**

Um zu gewährleisten, dass die dargebotenen visuellen Stimulationen auch von der Katze wahrgenommen werden, wurden die Augenbewegungen durch die intravenöse Gabe von Pancuronium (Pancuroniumbromid 0,8 mg/kg) unterdrückt und die Halothanzufuhr von 1,2% auf 0,6% gesenkt. Zur Erweiterung der Pupillen wurden den Versuchstieren Augentropfen mit dem Wirkstoff Atropinsulfat (1% Atropin-POS, Urspharm, Saarbrücken) verabreicht. Ebenfalls wurde das Zurückziehen der Nickhäute durch lokale Gabe von Neosynephrin (Phenylephrinhydrochlorid, Urspharm, Saarbrücken) erreicht. Abschließend wurden entsprechende schwarze Kontaktlinsen mit einer künstlichen Pupille eingesetzt. Die Kontaktlinsen korrigieren Refraktionsfehler und erlauben die Fokussierung auf den Stimulusbildschirm.

Die Präsentation erfolgte durch einen 21-Zoll Monitor mit einer Bildwiederholungsrate von 100 Hertz. Der Monitor hatte einen Abstand von 57 cm zu den Augen, so dass 1 cm auf dem Bildschirm 1° des Gesichtsfeldes der Katze entsprach. Zur Stimulation wurden schwarz-weiße Balkengitter mit einem Kontrast von 97% und einer räumlichen Frequenz von 0,15 Zyklen/°Sehwinkel präsentiert. Die Balkengitter wurden in diesem Versuch in 8 verschiedenen Orientierungskonfigurationen gezeigt (0°, 45°, 90°, 135°, 180°, 225°, 270°,

315°), die sich mit einer Geschwindigkeit von 16°/s orthogonal zur jeweiligen Orientierung des Balkengitters bewegten. Die Präsentation jedes Stimulus dauerte 3 Sekunden, danach erfolgte die Präsentation eines homogen grauen Bildschirms für 8 Sekunden. Dies hatte zur Folge, dass das durch den Stimulus induzierte Aktivitätsmuster wieder vollständig zur Grundaktivität zurückgekehrt war, bevor der nächste Stimulus gezeigt wurde. Die Abfolge der verschiedenen Orientierungskonfigurationen erfolgte in pseudo-randomisierter Reihenfolge um adaptive Effekte zu vermeiden. Ein Aufnahmeblock bestand aus der Wiederholung von 4 Trials mit zusammen 32 einzelnen Stimulationen, wobei ein Trial aus der Präsentation jeder der 8 Stimulusbedingungen bestand. Ebenfalls waren die mittlere Luminanz der Balkenmuster und des grauen Bildschirms identisch ( $LV = 33 \text{ cd/m}^2$ ) um den Einfluss von Helligkeitsunterschieden auf die kortikale Antwort zu verhindern. Der beschriebene Ablauf der visuellen Stimulierung und der folgenden Datenaufnahmen gehört zu einer etablierten Methode und wurde schon in mehreren Diplomarbeiten und Veröffentlichungen bereits beschrieben (Ratzlaff and Grinvald, 1991, Bonhoeffer and Grinvald, 1993b, Galuske et al., 2002, Dann, 2009, Hoffmann, 2010).

### 3.2.3.2 Aufnahme der Optical Imaging Daten

Zur Aufnahme der optischen Daten wurde eine CCD-Kamera (Dalsa 1M60P) verwendet, deren CCD-Chip aus 1024 x 1024 Sensoren mit einem Durchmesser von jeweils 12 µm bestand. Somit konnten eine 12 Bit Codierung 4096 ( $2^{12}$ ) Graustufen detektiert werden. Die Kamera wurde an einem Rahmen orthogonal zur Kortexoberfläche die optisch abgeleitet werden sollte (hier Area 18), befestigt. Durch die Zusammenstellung eines Tandem-Objektiv-Systems war es möglich mit einer geringen Tiefenschärfe und einer hohen numerischen Apertur auf circa 600-800 µm unterhalb der Kortexoberfläche zu fokussieren und damit den störenden Einfluss lokaler Blutgefäßen zu minimieren und Signale aus den supragranulären Kortexschichten zu erhalten. Für das Tandem-Linsen Makroskop (Ratzlaff and Grinvald, 1991) wurden zwei identische Objektive (Festbrennweite von 50 mm, Nikon f50 1,2, Deutschland) gegeneinander montiert und der Fokus jeweils auf unendlich gestellt. Anhand dieses Aufbaus konnte erreicht werden, dass es ohne Vergrößerung zu einer 1:1 Abbildung des aufgenommenen Bereiches auf dem CCD-Chip (1024 x 1024 Pixel) kam.

Für die Aufnahme des intrinsischen Signals wurde der Kortex mit Licht von einer Halogen-Kaltlicht-Lampe (HAL 100, 100 W, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena) mit einer Wellenlänge von 605 nm (Bandpassfilter,  $605 \pm 5 \text{ nm}$ ) beleuchtet. Das ausgestrahlte Licht wurde über zwei Glasfaserleiter, die seitlich der Kamera angebracht waren, so positioniert, dass die abzuleitende Kortexfläche vollständig und homogen ausgeleuchtet wurde. Vor jeder Aufnahmeeinheit wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm ein Bild der Kortexoberfläche mit dem zugehörigen Gefäßmustern aufgenommen.

Die so generierten Daten wurden mit einem Imager 3001 System (Optical Imaging Inc., Rehovot, Israel) aufgenommen und über das Imager 3001 Lab Interface an den Daten-Akquisition-Computer zur Speicherung weitergeleitet. Die Datenaufnahme wurde 3 Sekunden vor der Präsentation des Stimulus gestartet und 5 Sekunden nach der Präsentation gestoppt. Die aufgenommenen Bilder des intrinsischen Signals wurden mit einer Aufnahmerate von 100 Hertz aufgenommen und, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern und durch eine Mittelung von jeweils 20 Bildern auf eine Frame-Rate von 5 Hertz reduziert. Die Auflösung der erhaltenen Bilder wurde durch ein 2 x 2 „Binning“ auf 512 x 512 Pixel verkleinert was dazu führt, dass ein Pixel 24 x 24 µm der Kortexoberfläche entspricht.

### 3.2.4 TRACERINJEKTIONEN

Für die Untersuchungen von neuroanatomischen Projektionen und Verbindungsmustern wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von Tracern verwendet. So konnte man zum Beispiel durch multiple Injektionen von Meerrettich-Peroxidasen, Biocytin oder pflanzlichen Lektinen (Kobbert et al., 2000) in verschiedene Gehirnareale Informationen über die globalen Projektionen erlangen (Felleman and Van Essen, 1991, Payne and Lomber, 2003). Der Nachteil dieser Farbstoffe war jedoch, dass die erhaltenen Daten keine Angaben über die Morphologie von Projektionen liefern konnten.

Für die Visualisierungen von sehr feinen strukturellen Merkmalen von Neuronen wurden daher in dieser Studie Tracer mit Dextran als Grundkomponente gewählt.

#### 3.2.4.1 Tracer Dextranamine

Dextrane sind hochmolekulare, hydrophile Polysaccharide auf der Basis von Glukose-Monomeren mit einem molekularen Gewicht von 10000 MW. Sie sind wasserlöslich, weisen eine nur geringe Toxizität auf und werden durch ihre  $\alpha$ -1,6-Glukose-Ketten nicht durch endogene Glykosidasen abgebaut, womit sie über einen längeren Zeitraum innerhalb der Zelle nachweisbar bleiben (Reiner et al., 2000). Die Applikation des Tracers ins Gewebe kann unterschiedlich erfolgen. In dieser Arbeit wurde die Methode der Druckinjektion gewählt, die zu einem späteren Zeitpunkt ausführlich erklärt wird. Der Aufnahmemechanismus des Tracers in die Zelle ist unbekannt, scheint aber endozytotisch für intakte Neurone zu sein. Im Falle einer Druckinjektion wird der Tracer vornehmlich von beschädigten Neuronen aufgenommen (Fritsch, 1993).

Um den Tracer im Gewebe mittels Formalin fixieren zu können und somit eine spätere histologische Auswertung zu ermöglichen, wurde Dextran gewählt, an das das Amin Lysin gekoppelt wurde (Gimlich and Braun, 1985, Kobbert et al., 2000).

Dextran wird von der Injektionsstelle in anterograder (in Richtung der Terminalien) und in retrograder (in Richtung des Zellkörpers) Richtung innerhalb des Neurons transportiert (Veenman et al., 1992, Fritsch, 1993). Der Transport findet vorwiegend über Diffusion statt,

da eine Behandlung mit 1  $\mu$ M Colchicin (blockt den Mikrotubulizusammenbau) und Nocodazol (depolymerisiert die labile und die große Fraktion der stabilen Domäne von Mikrotubuli) die Transportstrecken nicht veränderten. Die Diffusion innerhalb der Zelle erfolgt mit einer Geschwindigkeit von  $\sim 1$  mm/h, das entspricht etwa 1/10 des schnellen axonalen Transportes von homoiothermen Tieren (8,3 -16,6 mm/h bei 37° C) (Fritsch, 1993). Durch die passive Verbreitung findet kein transsynaptischer Transport statt und es besteht die Möglichkeit, auf dieser Basis einzelne Neurone zu identifizieren und zu rekonstruieren (Wouterlood and Jorritsma-Byham, 1993).

Für die unterschiedlichen Fragestellungen dieser Arbeit wurden Dextramine mit verschiedenen Eigenschaften gewählt. Für die Rekonstruktion von einzelnen Neuronen im primären visuellen Kortex der Katze wurde das Dextran mit einer Kopplung an Biotin (BDA) bevorzugt. Diese Kopplung ermöglicht seine spätere Entwicklung der Färbung mit Umsetzung von DAB (3,3'-Diaminobenzidin) über die Avidin-Biotin-Komplex-Methode und somit eine permanente Färbung, die unter dem Lichtmikroskop auswertbar ist (weitere Details zur Durchführung der Färbung in Kap. 3.3.3) (Brandt and Apkarian, 1992).

Das Reaktionsprodukt dieser Färbung resultiert in einer kompletten Färbung des Zytoplasmas, der Dendriten, des Axoplasmas der Neurone und der Matrix der Axonterminalien in die der Tracer diffundierte (Xue et al., 2004). Für die retrograde Untersuchung der Projektionen von PMLS und CGL in den primären visuellen Kortex wurden zwei fluoreszierende Dextramine gewählt. Dextrane gekoppelt mit Fluorescein und Tetramethylrhodamin haben die gleichen Transporteigenschaften wie BDA (Glover et al., 1986) und zeichnen sich durch eine hohe Stabilität bei der Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop aus.

Für die Injektionen wurden jeweils 10% ige Lösungen der einzelnen Dextrane mit einer 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,4) hergestellt. Alle Dextrane wurden von Invitrogen, Molecular Probes, Karlsruhe bezogen (Tab. 3.1).

Tracer	Konjugat	Amin	MW	Nummer	Lösung
Dextran	Biotin	Lysin	10000	D 1956	10%
Dextran	Fluorescein	Lysin	10000	D 1820	10%
Dextran	Tetramethylrhodamin	Lysin	10000	D 1817	10%

**Tabelle 3.1:** Übersicht über die verwendeten Dextrane. Angegeben sind der Grundtracer, seine angehängten Konjugate, das Molekulare Gewicht (MW), die Bestellnummer und die Konzentration der jeweiligen Injektionslösung.

### 3.2.4.2 Herstellung Glaskapillaren

Für die Tracerinjektionen wurden beschichtete Borosilikatglasröhrchen mit Filament mit einem äußeren Durchmesser von 1,2 mm und einer Länge von 8 mm (GB120F-8P, Science

Products, Hofheim) verwendet, mit Hilfe eines Puller (Vertical Pipette Puller 700C, David Kopf Instruments) wurden Spitzen mit dem Durchmesser von 20 – 50  $\mu\text{m}$  gezogen. Der Spitzendurchmesser wurde unter mikroskopischer Kontrolle bestimmt.

Um zur genauen Positionierung der Injektionen in PMLS neben den stereotaktischen Koordinaten, mit plattinierte Wolfram-Elektroden mit einem Durchmesser von 150  $\mu\text{m}$  und einer Impedanz (0,5 – 0,7  $\text{M}\Omega$ ) auch eine funktionelle Charakterisierung vornehmen zu können, wurden die entsprechenden Glaskapillaren zusätzlich noch mit Mikroelektroden bestückt, die seitlichen an die Glaskapillare geklebt wurden. Anhand der Positionen der rezeptiven Felder der so abgeleiteten Neurone konnte dann die Injektionskanüle in einer zentralen Repräsentation von PMLS platziert werden.

### 3.2.4.3 Tracerinjektionen in PMLS

Für die Bestimmung der genauen Position der Injektion in PMLS wurde in einigen Experimenten allerdings auf die Kombination von Ableitelektrode und Injektionskanüle verzichtet und PMLS wurde anstatt mit einer einzelnen Mikroelektrode kartiert. Im Anschluss daran wurde dann die Injektionskanüle an die vorherige Position der Mikroelektrode gebracht.

Für die Injektionen in PMLS wurden Glaskapillaren mit dem Durchmesser von 20 - 50  $\mu\text{m}$  verwendet. Diese wurden zuerst mit der 10% BDA-Lösungen befüllt und im Anschluss auf eine ebenfalls mit 10% BDA-Lösung befüllte Hamilton-Spritze aufgesetzt. Die Kapillare und die Hamilton-Spritze wurden mit Paladur fest verbunden. Beide wurden nun in den Mikromanipulator eingesetzt und im gleichen Winkel und mit der gleichen Einstechtiefe wie die Elektrode in den Kortex eingeführt. Über einen Zeitraum von 10 Minuten wurden insgesamt 4  $\mu\text{l}$  BDA-Lösung in das Gewebe injiziert. Erst nach einer Wartezeit von 10 Minuten nach Abschluss der Injektion wurde die Kapillare aus dem Gewebe entfernt und die Kraniotomie wieder verschlossen. Die Parameter der Druckinjektion, wie Konzentration und Menge des Tracers, pH-Wert der Injektionslösung und Spitzendurchmesser wurden durch Vorversuche und anhand von Versuchsprotokollen (Brandt and Apkarian, 1992, Veenman et al., 1992, Rajakumar et al., 1993, Wouterlood and Jorritsma-Byham, 1993, Rockland and Knutson, 2000, Luo et al., 2001, Wouterlood et al., 2002, Xue et al., 2004, Raju and Smith, 2006) optimiert.

Um ein späteres Alignment zwischen den funktionellen Karten und den rekonstruierten Axonen durchführen zu können, wurden an den Rändern der funktionellen Karten Referenzmarkierungen im Gewebe platziert. Dies geschah durch Einführung von dünnen Wolframdrähten, die dann nach der Fixierung vorsichtig aus dem Gewebe entfernt wurden. So können dann durch Fixierungs- und FärbeprozEDUREN Gewebeschrumpfungen in x-/y- und z-Richtung gut kontrolliert werden. Die Positionen der Elektroden wurden in das

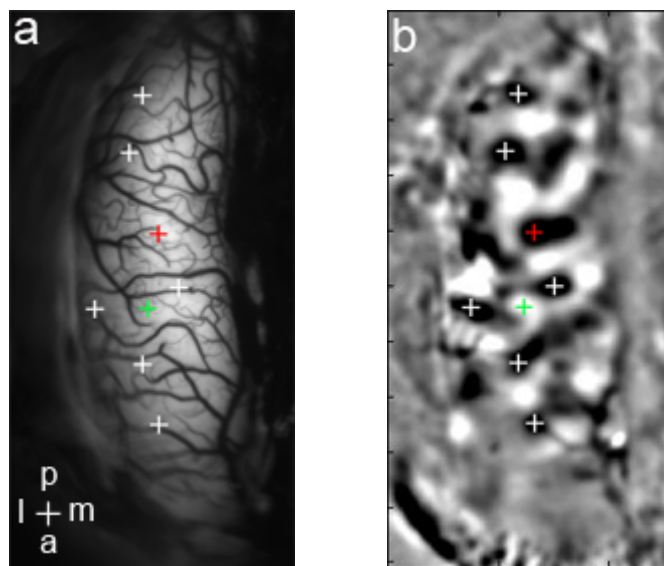
Blutgefäßbild eingetragen (Abb. 3.7). Aus der Differenz zu den Einstichkanälen der Drähte im Gewebe konnte der Schrumpfungsfaktor in x- und y-Richtung berechnet werden und die Optical Imaging Karten zur Deckung mit den angefertigten Rekonstruktionen gebracht werden.

#### 3.2.4.4 Tracerinjektionen in Area 18

Der Ablauf der Tracerinjektion in Area 18 entspricht dem Vorgehen der oben beschriebenen Injektion in PMLS.

Für die Injektion in Area 18 wurden 2 unterschiedlich fluoreszierende Tracer mit den gleichen Laufeigenschaften wie BDA gewählt. Es wurden Dextrane gekoppelt mit Fluorescein und Tetramethylrhodamin in einer 10% igen Lösung verwendet.

Für die Positionsbestimmung der zwei Injektionsstellen bei Katze 5 wurden die Optical Imaging Daten aufgenommen und die Differenzkarten für horizontale und vertikale Stimuli berechnet. Anhand dieser Karten wurden zwei Positionen im Oberflächenbild für die Tracerinjektionen ausgewählt (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2:** Aufnahme der Kortexoberfläche (a) und der Differenzkarte für horizontale und vertikale Stimuli in Katze 5 (b). Die Injektionsstelle für Fluorescein ist in beiden Bildern mit einem grünen Kreuz markiert und für Tetramethylrhodamin mit einem roten Kreuz gekennzeichnet. Die weißen Kreuze befinden sich in a und b auf den gleichen Positionen (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral).

#### 3.2.5 PERFUSION

Nach Abschluss aller Experimente wurden die Tiere euthanasiert und das Gewebe durch transkardiale Perfusion mit Paraformaldehyd fixiert. Dies erfolgte durch intravenöse Gabe von Narcoren (Pentobarbital 200 mg/kg, Veterinaria AG, Zürich) nach Eintritt des Herzstillstandes wurde der Thorax eröffnet und durch die Aorta ascendens wurde eine Pufferlösung (0,9% NaCl in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4) in das Gefäßsystem gepumpt. Das Blut konnte durch einen kleinen Einschnitt am rechten Vorhof aus dem System

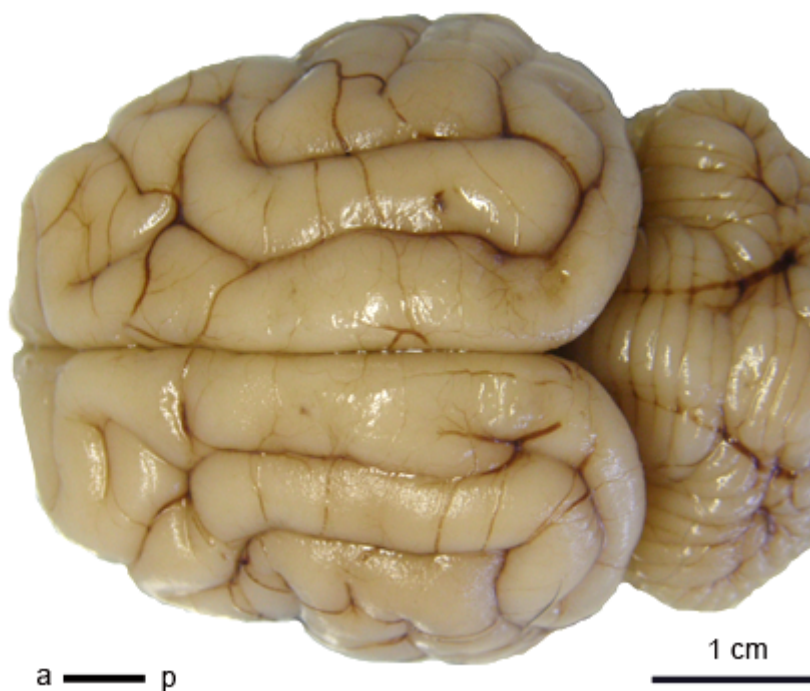


auslaufen. Anschließend wurde über die selbe Kanüle eine Perfusionslösung (4% Paraformaldehyd) in das Gefäßsystem gepumpt. So konnte in sehr kurzer Zeit eine vollständige Fixierung des Gewebes erreicht werden. Die Fixierung mit Formaldehyd bewirkt eine Vernetzung der Eiweißstruktur und unterbindet so die nach dem Tod autolytisch wirkenden Vorgänge. Ebenfalls bleibt die Zellstruktur komplett erhalten. Nach der Perfusion wurde das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel entnommen. Für die weitere histologische Auswertung wurde das Gehirn in 4% Paraformaldehydlösung über Nacht nachfixiert.

### 3.3 HISTOLOGISCHE GEWEBEAUFARBEITUNG UND FÄRBUNGEN

#### 3.3.1 GEWEBEFIXIERUNG

Das Gewebe wurde in einer frischen 4% Paraformaldehydlösung mindestens 7 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Danach erfolgte die Überführung in 0,1 M Phosphatpuffer und die Entfernung der Dura mater als Vorbereitung für die Anfertigung der Gewebeschnitte (Abb. 3.3).

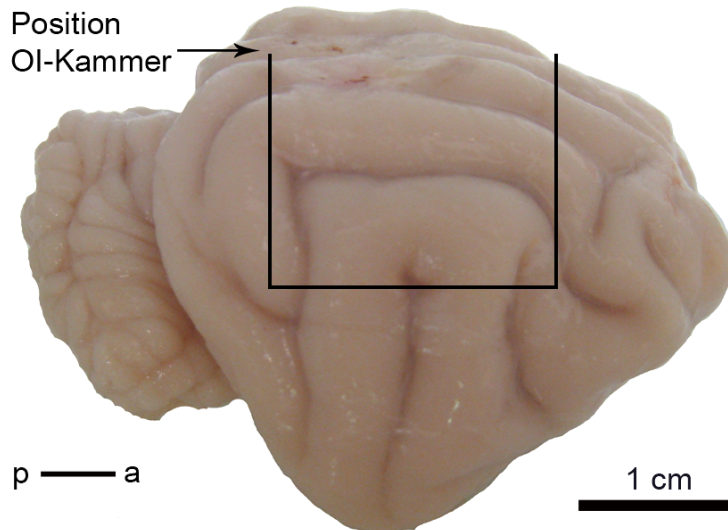


**Abbildung 3.3:** Aufsicht auf das herauspräparierte und nachfixierte Gehirn von Katze 2. Der Maßstab entspricht 1 cm (a: anterior, p: posterior).

#### 3.3.2 ANFERTIGUNG VON GEWEBESCHNITTEN

Für die Rekonstruktion von einzelnen Neuronen mit ihren Projektionen war es nötig, komplette Schnittserien der verwendeten Gehirne anzufertigen. Dabei musste mit größter Sorgfalt vorgegangen werden, da der Verlust von nur einem Gewebeschnitt zu einer unvollständigen Rekonstruktion geführt hätte. Zur Anfertigung der Serienschnitte wurden aus dem Gehirn die zu untersuchenden Bereiche herausgeblockt (Abb. 3.4). Diese Gewebeblöcke wurden zur Stabilisierung in 4% Agar eingebettet und mit einem Vibratom

(VT 1000S, Leica Wetzlar) mit einer Schnittdicke von 60 µm geschnitten. Für die unterschiedlichen Fragestellungen wurden entweder Horizontalschnitte (Rekonstruktion von Axonen und die Analyse der Zellkörperverteilung in PMLS) oder Koronarschnitte (Analyse der Verteilung der Zellkörper in CGL) benötigt.

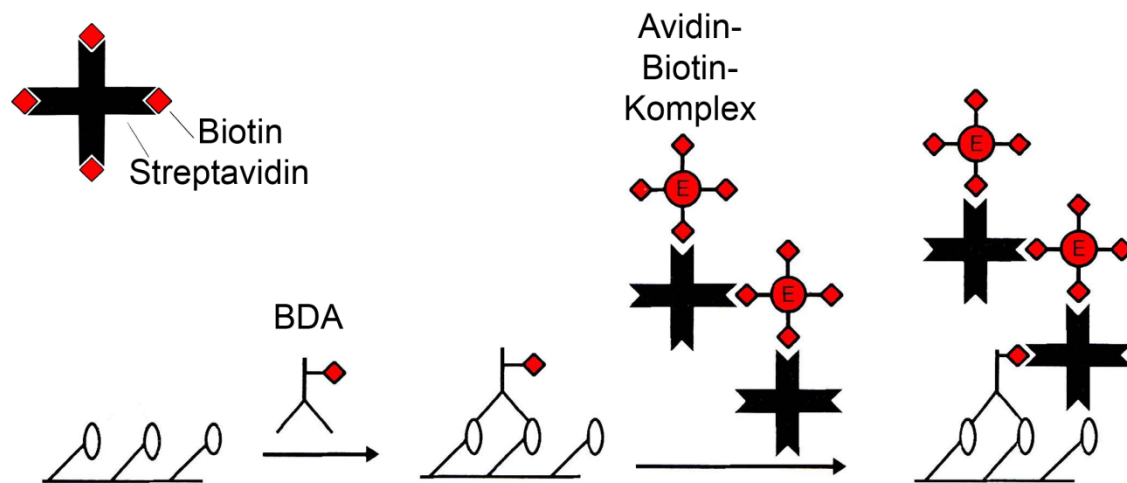


**Abbildung 3.4:** Lateralansicht der rechten Hemisphäre der Katze 5. Oben ist die Position der Optical Imaging Kammer sichtbar. Der schwarze Kasten umrahmt den Bereich, der histologisch aufgearbeitet wurde (a: anterior, p: posterior, OI: Optical Imaging). Der Maßstab entspricht 1 cm.

### 3.3.3 PRINZIP DER BDA-FÄRBUNG

BDA wurde mittels Druckinjektion ins Gewebe injiziert, und nach 7 Tagen Laufzeit mittels Perfusion und Nachfixierung mit Paraformaldehyd im Gewebe fixiert. Nach der Anfertigung der Gewebeschnitte wurden diese in einer mit Methanol verdünnten  $H_2O_2$ -Lösung inkubiert. Diese Behandlung sollte die Aktivität der endogenen Peroxidasen vieler Zellen, insbesondere innerhalb der Blutgefäße minimieren und die Hintergrundfärbung reduzieren. Anschließend wurden die Schnitte mit der ABC-Methode (ABC: Avidin-Biotin-Komplex, Vectastain ABC Kit, Peroxidase Standard, PK – 4000, Vector Laboratories, USA) behandelt um das Tracersignal zu verstärken. Das ABC-Kit beinhaltet Lösungen von Komplexen aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle Biotin (Vitamin H) in einem festen, selbst durch proteolytische Enzyme nicht angreifbaren Komplex zu binden. Da am gleichen Ort mehrere dieser Komplexe binden können, lässt sich so die Enzymkonzentration an der Position des biotinylierten Dextranamins stark erhöhen (Abb. 3.5). Nach der Inkubation mit den ABC-Kit-Lösungen wird über die gebundene Meerrettichperoxidase und den Zugaben von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), Glukose, und Glukoseoxidase eine weitere stabilisierende Reaktion ausgelöst. Glukoseoxidase reagiert mit Glukose zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid, wobei die an den Enzymkomplex gebundene Meerrettichperoxidase als Katalysator für die weitere Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff dient.

Dieser Sauerstoff hat die Oxidation des elektronenspendenden Chromagens DAB zur Folge, welches sich als ein brauner, wasserunlöslicher und lichtbeständiger Niederschlag am Reaktionsort bildet (Aiger, 1997).



**Abbildung 3.5:** Immunenzymatische Methode mit der Verstärkung über den Avidin-Biotin-Komplex. An ein Glykoprotein Avidin können vier Moleküle Biotin (Vitamin H) in einem festen, selbst durch proteolytische Enzyme nicht angreifbaren Komplex binden (links oben dargestellt). Dieser Komplex bindet an BDA, welches durch die Fixierung mittels Formaldehyd im Gewebe gebunden ist. An den Avidin-Biotin-Komplex ist eine Peroxidase (E) gebunden, die im weiteren Verlauf der Färbung als Katalysator für die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff dient (modifiziert nach Aiger, 1997).

Abschließend erfolgten das Aufziehen der Schnitte auf gelatinierte Objektträger, die Entwässerung der Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Eindeckelung mit Epoxidharz für die Betrachtung unter dem Lichtmikroskop.

Die Gewebeschnitte aus den Versuchen mit den Dextranaminen gekoppelt an Fluorescein und Tetramethylrhodamin wurden auf ungelatinierte Objektträger aufgezogen und mit Kaisers Gelatine für die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop eingedeckelt. Das genaue Protokoll der BDA-Färbungen und die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen befinden sich im Anhang.

### 3.3.4 FÄRBUNG ZUR AREALBESTIMMUNG UND DER KORTIKALEN SCHICHTUNG

Für die Bestimmung der Areale und der kortikalen Schichtung wurde in dieser Arbeit die Nissl-Färbung verwendet. Bei dieser Färbung wird mit Hilfe des Farbstoffs Kresylviolett eine Blaufärbung von Zellkörpern und Gliazellen hervorgerufen (Romeis, 1989). Der Farbstoff lagert sich basophilen Molekülen wie DNA, RNA und Stapeln des endoplasmatischen Retikulums an (Lang, 2006). Durch die Blaufärbung heben sich die Zellkörper deutlich von den ungefärbten Fasern der weißen Substanz ab und können somit für die gewünschten Bestimmungen herangezogen werden. Das genaue Protokoll der Nissl-Färbung befindet sich im Anhang.

### 3.4 AUSWERTUNG

#### 3.4.1 ANALYSE DER OPTICAL IMAGING DATEN

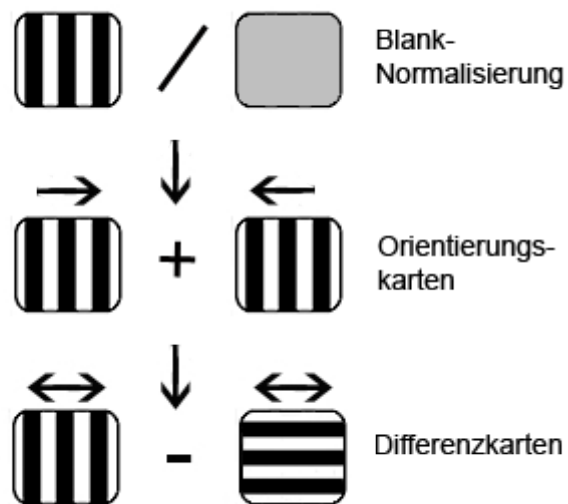
Die Analyse der Daten erfolgte anhand von in der Arbeitsgruppe entwickelten MatLab-Programmen (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA).

Um Orientierungspräferenzkarten zu erhalten muss die stimulusinduzierte Veränderung der Lichtabsorption, die im Bereich von 1-2% des gesamten Lichtsignals liegt, berechnet werden. Dazu wurden Kamerabilder in einem Zeitraum von 2 bis 5 Sekunden nach Stimulusbeginn gewählt, da in diesem Abschnitt die stärkste kolumnäre optische Aktivität des hämodynamischen Signals vorhanden war (Niessing et al., 2005) und in Relation zur optischen Grundaktivität gestellt. Diese Grundaktivität wurde aus 6 Aufnahmen aus einem Analysefenster von 0 bis 3 Sekunden vor Stimulusbeginn gemittelt.

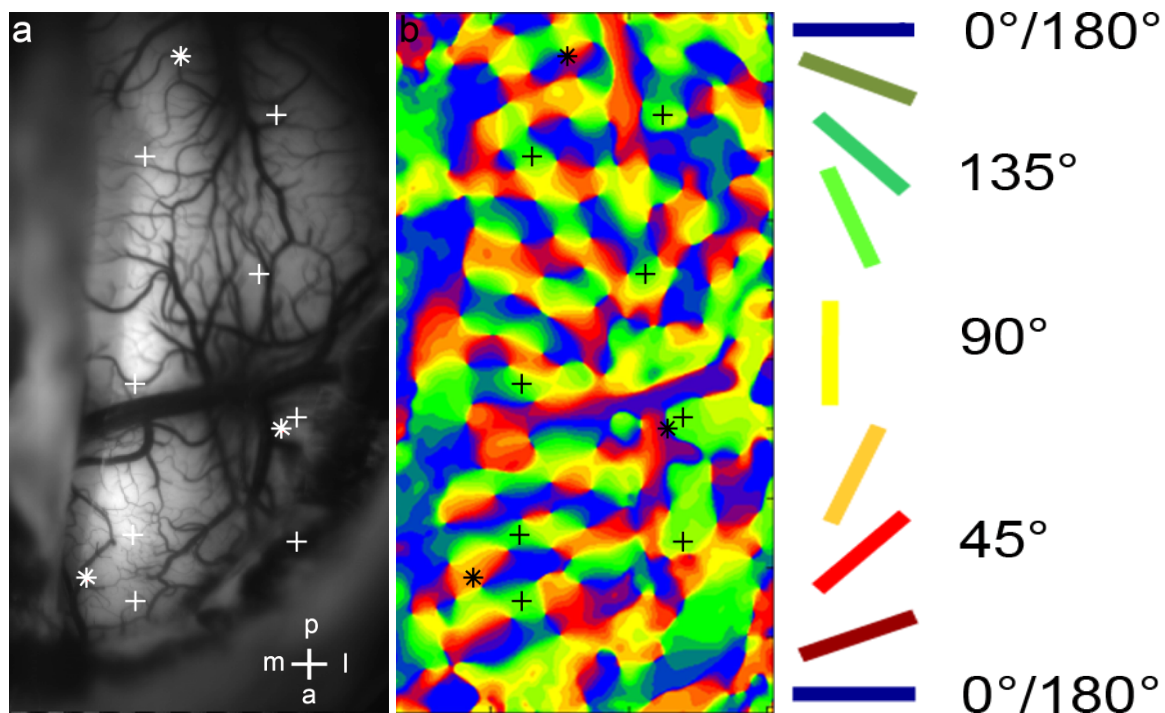
Nun wurden die stimulusinduzierten gemittelten Bilder einer Stimulusbedingung durch ihr korrespondierendes Bild vor der Stimulation dividiert. Die nun erhaltenen Pixel-Werte entsprechen der prozentualen Änderung dann der Lichtintensität zwischen der Grundaktivität und der Stimulationsaktivität (Mann and Whitney, 1947).

Für die Erstellung von Orientierungskarten, die nur die Aktivierung der Stimulusorientierung unabhängig von der Bewegungsrichtung darstellen, wurden die Bilder der gleichen Stimulationsorientierung aber mit entgegengesetzter Bewegungsrichtung gemittelt. Zur Erstellung von Differenzkarten, die bei der Bestimmung der Injektionspositionen in Area 18 benötigt wurden, wurde von den jeweiligen Orientierungskarten die entsprechende Karte der orthogonalen Stimulusorientierung abgezogen (Abb. 3.6). Dies ist möglich, da sich der primäre visuelle Kortex in Area 18 räumlich so ausbildet, dass die Orientierungskolumnen orthogonaler Orientierungen in einer inversen räumlichen Organisation zueinander vorliegen (Bonhoeffer and Grinvald, 1993a, Shmuel and Grinvald, 1996). Die Differenzkarten repräsentieren somit die spezifische Antwort auf eine bestimmte Stimulusorientierung durch helle Bereiche, wohingegen ein orthogonal orientierter Stimulus durch dunkle Bereiche dargestellt ist. Es wurden jeweils zwei Differenzkarten erstellt, eine für die Repräsentation der Orientierungen 0° und 90° (kardinale Differenzkarte) und eine Karte für die Orientierungen 45° und 135° (oblique Differenzkarte).

Zusätzlich wurden Winkelkarten („Angle Maps“) für das spätere Alignment der rekonstruierten Axone und der physiologischen Eigenschaften der entsprechenden Kortexbereiche erstellt. Die spezifische Aktivierung des Kortex wurde durch eine pixelweise Vektoraddition der vier Orientierungskarten berechnet. Dabei wurde für jeden Pixel ein Summenvektor berechnet, der den Winkel mit der stärksten Signalantwort zwischen 0° und 180° angibt. Dieser Winkel wurde dann farbcodiert dargestellt (Abb. 3.7).



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der Berechnung von Orientierungskarten und Differenzkarten. Zuerst erfolgt die Mittelung der aufgenommenen Bilder für jede Stimulusorientierung und die Division durch die gemittelten Bilder der Grundaktivität (Blank-Normalisierung). Für die Berechnung der Orientierungskarten werden die normalisierten Daten gleicher Balkenorientierung mit entgegengesetzter Bewegungsrichtung zusammengefasst. Für die Berechnung von Differenzkarten werden zum betrachteten Stimulus die orthogonalen Orientierungskarten abgezogen.



**Abbildung 3.7:** Bild der Kortexoberfläche mit den entsprechenden Gefäßmustern (a) und Winkelkarte (b) von Katze 4. Die Winkelkarte wurde für die spätere Zusammenführung von anatomischen und physiologischen Eigenschaften der rekonstruierten Axone verwendet. Weiße und schwarze Kreuze befinden sich auf identischen Positionen in a und b. Die weißen und schwarzen Sterne geben die gleichen Positionen der Referenzmarkierungen an. Rechts ist die Farbcodierung der Winkelkarte dargestellt wobei jedem Winkel eine Farbe zugeordnet wurde (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral).

### 3.4.2 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

#### 3.4.2.1 Dokumentation der Gewebeschnitte

Die lichtmikroskopische Betrachtung und Dokumentation der Gewebeschnitte erfolgte an einem Axioskop I (Carl Zeiss, Jena) in Verbindung mit einem motorisierten Objektisch (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY) und einer Kamera (Microfire, Optronics, Coleta, California). Die Aufnahmen und Zeichnungen wurden im Programm Neurolucida von MicroBrightField, Inc. (Colchester, Vermont, USA) angefertigt und analysiert. Mit der Software Neurolucida ist es möglich, 3-D-Gehirnkartierungen, 3-D-Neuronenrekonstruktionen, 3-D-Schnittserienrekonstruktionen, Morphometrie und neuroanatomische Analysen durchzuführen. In Verbindung mit einem Setup aus Mikroskop, Kamera und einem motorisierten XYZ-Objektisch kann man im Programm Neurolucida genaue Abbilder des Gewebes anfertigen und über mehrere Schnitte rekonstruieren. Im Programm Neurolucida Explorer, einem Zusatzmodul, kann die Auswertung der angefertigten Zeichnungen mit vielen unterschiedlichen Analysemethoden (z. B. Scholl-Analyse, Zellzählungen, Längen- und Flächenmessungen, Verzweigungsanalysen usw.) erfolgen (Glaser and Glaser, 1990).

Die Fluoreszenzauswertung wurde mit dem gleichen System und einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung (HBO 103, Zeiss, Jena) durchgeführt. Für den Tracer Fluorescein wurden der Filtersatz 9 (Zeiss, Jena) mit einer Anregungswellenlänge von 450 - 490 nm und einem Langpassfilter von 515 nm und für den Tracer Tetramethylrhodamin der Filtersatz 15 (Anregung: BP 546/12 nm, Emission: LP 590nm, Zeiss, Jena) verwendet.

Die angefertigten Bilder, Zeichnungen und Analysen wurden in den Programmen Adobe PhotoShop CS3 und Adobe Illustrator CS5 (beides von Adobe Systems) weiter bearbeitet und ausgewertet.

#### 3.4.2.2 Schrumpfungskorrektur

Durch die Fixierungs- und FärbeprozEDUREN kam es zu Gewebeschrumpfungen in x-/y- und z-Richtung. Die Schrumpfung in x- und y-Richtung ist in der Regel nicht messbar, sollte jedoch für alle Schnitte einer Serie annähernd gleich sein. Dieses Problem wurde in der vorliegenden Studie durch das Einfügen von Referenzmarkierung mittels dünner Wolframdrähte umgangen. Der Abstand der Markierung vor und nach der Fixierung und Färbung konnte bestimmt werden und der Schrumpfungsfaktor über die Differenz der beiden Werte zueinander bestimmt werden. Die Schrumpfung in z-Richtung wurde zusätzlich durch Kapillarkräfte während des Eindeckens verstärkt. Daher wurde vor der Anfertigung der Axonrekonstruktionen für die jeweilige Schnittserie ein Schrumpfungsfaktor der z-Achse berechnet. Die Berechnung erfolgte durch die zufällige Auswahl von 10 Stellen auf 10 Schnitten einer Serie. An diesen Stellen wurde die Dicke des Schnittes mit dem Programm

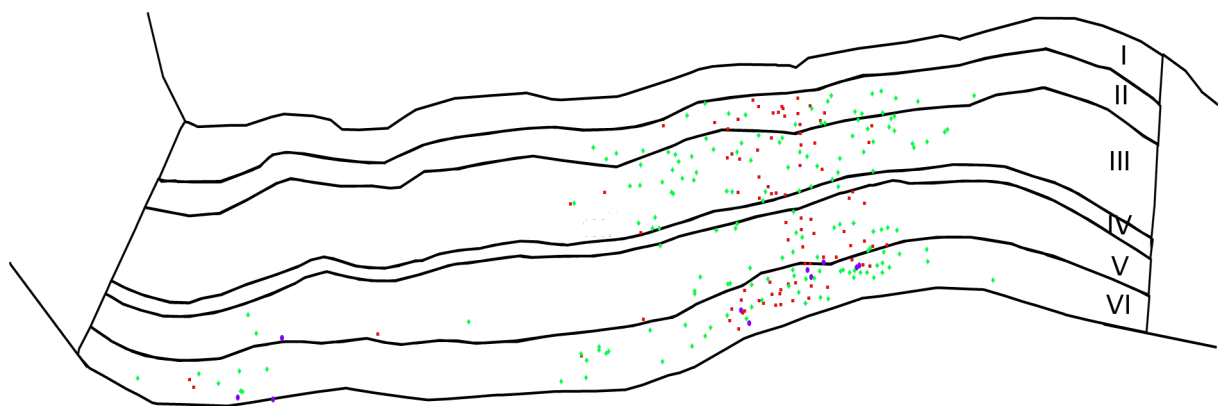


Neurolucida gemessen. Der erhaltene Wert wurde gemittelt und der Mittelwert als Schnittdickenwert für die Rekonstruktion verwendet.

### 3.4.2.3 Neuronenverteilung und Zellkörpergröße in PMLS und im CGL

Für die Analyse der Zellkörperverteilung in PMLS wurden Horizontalschnitte und für die Analyse der Verteilung der Zellkörper im CGL Koronarschnitte verwendet. Der Ablauf der Bestimmung der Neuronenverteilung wird nun am Beispiel von PMLS dargestellt.

Zuerst wurden die äußere Kontur des Gewebeschnittes, die Grenzen von Schicht I zu Schicht II und die Grenze zur weißen Substanz bei schwacher Durchlichtbeleuchtung im Programm Neurolucida nachgezeichnet. Nachdem die Position der Zielregion bestimmt war, wurde unter Verwendung der Fluoreszenzlampe mit den entsprechenden Filtern (9 und 15) bei 100-facher Vergrößerung jedes fluoreszierende Neuron, das klar als solches zu erkennen war, mit einem Marker versehen. Die roten Marker kennzeichneten die Position von Zellen, die den Tracer Tetramethylrhodamin enthalten, die grünen Marker die Position von Zellen, die den Tracer Fluorescein enthalten. Die lila Marker befinden sich an den Positionen, an denen Zellen beide Tracer enthalten. Zellen, deren Zellkörper sich komplett darstellte, wurden mit einer Kontur umrandet, um später mit dem Programm Neurolucida Explorer die Zellkörpergröße bestimmen zu können. Nachdem der ausgewählte Gewebebereich vollständig aufgenommen war, wurde der Gewebeschnitt wieder aufgedeckt und für eine Färbung mit Kresylviolett auf gelatinierte Objektträger aufgezogen. Nach der erfolgreichen Nissl-Färbung konnte die vorhandene Zeichnung der Zellen und der Konturen deckungsgleich mit dem gefärbten Schnitt gebracht werden, um so die kortikalen Schichten zu bestimmen (Abb. 3.8). Die Schrumpfung des Gewebes durch die Nissl-Färbung war vorwiegend in Schicht I erkennbar. Da aber die Grenze zwischen Schicht I und Schicht II schon am ungefärbten Schnitt eingezeichnet wurde, konnte die Schrumpfung in Schicht I für die Bestimmung der Dicke der übrigen Schichten vernachlässigt werden.



**Abbildung 3.8:** Beispielzeichnung für die Bestimmung der Neuronverteilung in PMLS. Die oberste Linie ist äußere Kontur des Gewebeabschnittes. Die Grenzen der Kortexschichten sind mit schwarzen Linien gezeichnet und mit römischen Zahlen (I bis VI) gekennzeichnet. Die Linie unterhalb von Schicht VI beschreibt die Grenze zur weißen Substanz. Die roten Marker kennzeichnen die Position von Zellen, die den Tracer Tetramethylrhodamin

enthalten, die grünen Marker die Position von Zellen, die den Tracer Fluorescein enthalten und die lila Marker die Position der Zellen, die beide Tracer enthalten.

Nachdem für alle Schnitte einer Serie die Position der Zellen und die kortikale Schichtung bestimmt waren, konnte anhand der äußeren Konturen der Schnitte eine dreidimensionale Rekonstruktion des Gewebes mit dem „Serial Section Manager“ im Programm Neurolucida erstellt werden. Diese Rekonstruktion wurde für die späteren Analysen im Neurolucida Explorer, Excel und in MatLab benötigt. Im Neurolucida Explorer wurden die Zellkörpergrößen und die Koordinaten jedes einzelnen Markers mit deren Schichtzugehörigkeit bestimmt. Diese Datentabellen wurden im Software Programm Excel 2007 und 2010 (Microsoft Office, Microsoft Corporation, Redmond USA) nach Markern und Schichten sortiert und Häufigkeitsverteilungen der Marker und der Zellkörpergrößen erstellt. Für die bessere Visualisierung der dreidimensionalen Struktur wurden die Datentabellen der Marker in ein dafür von Constantin Rothkopf (TU Darmstadt, Fachbereich Humanwissenschaften) geschriebenes Modellierungsprogramm in MatLab eingelesen, normalisiert und die Verteilung der Zellen im Raum pro Schicht für jeden Marker einzeln und abschließend für alle Marker zusammen dargestellt.

Die Bestimmung der äußeren Konturen vom CGL erfolgte anhand der Beschreibungen von Laties (Laties and Sprague, 1966) und Thuma (Thuma, 1928). Die Zuordnung der Repräsentationen des visuellen Feldes zu den unterschiedlichen Schichten und Positionen vom CGL erfolgte mittels der Studien von Sanderson (Sanderson, 1971a, b).

#### **3.4.2.4 Axonrekonstruktion von PMLS in den primären visuellen Kortex**

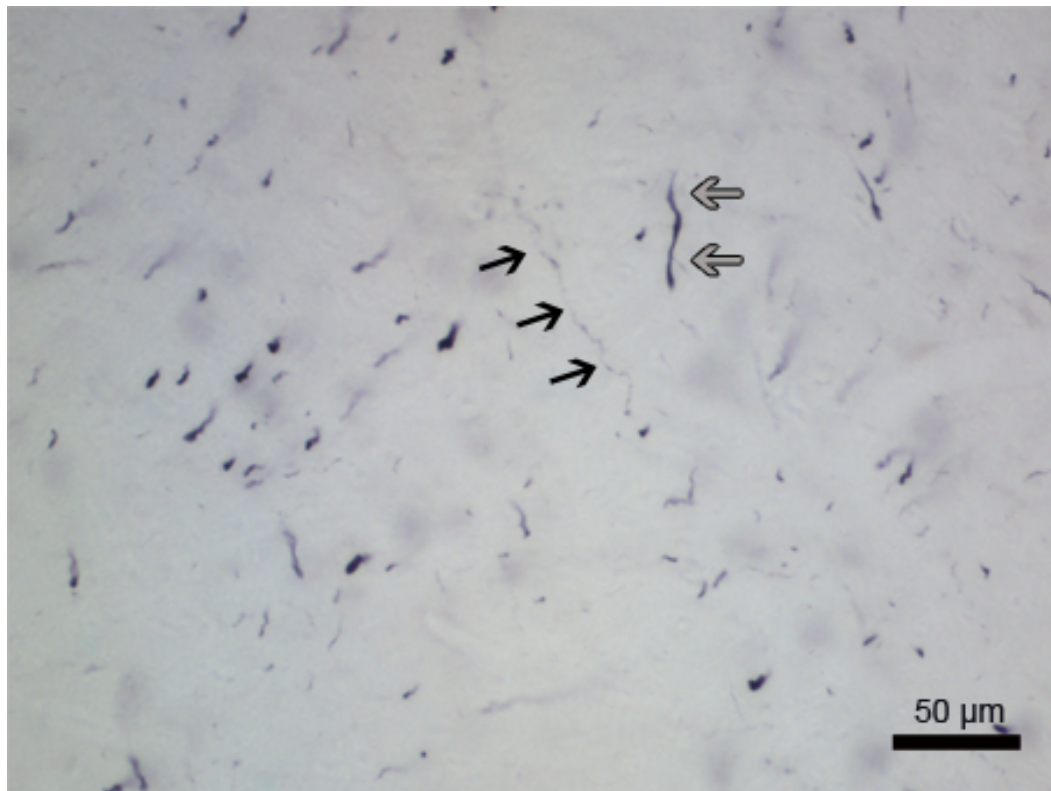
Vor Beginn der Axonrekonstruktion wurde die Schrumpfung des Gewebes in z-Richtung bestimmt. Dabei beträgt die mittlere Schnittdicke bei Katze 1 nur noch 25  $\mu\text{m}$  und bei Katze 4 nur 30  $\mu\text{m}$  bei einer initialen Schnittdicke von 60  $\mu\text{m}$ . Diese ermittelten Werte wurden als Schnittdickenwerte für die Rekonstruktion eingesetzt. Auf der Basis dieser Werte wurde dann für jeden Schnitt einer Schnittserie eine Ebene an einer entsprechenden z-Achsenposition im Serial Section Manager definiert.

Um den Startpunkt einer Rekonstruktion zu definieren, wurden die Gewebeschnitte mit hoher Vergrößerung unter den Lichtmikroskop komplett untersucht und Stellen mit langen Axonsegmenten in der weißen Substanz, wurden markiert. Anterograd markierte Feedback-Axonsegmente haben in der weißen Substanz einen Durchmesser von nur circa 1  $\mu\text{m}$  und heben sich dadurch von den dickeren Feedforward-Segmenten ( $\sim 3 \mu\text{m}$ ) ab (Rockland and Knutson, 2000) (Abb. 3.9).

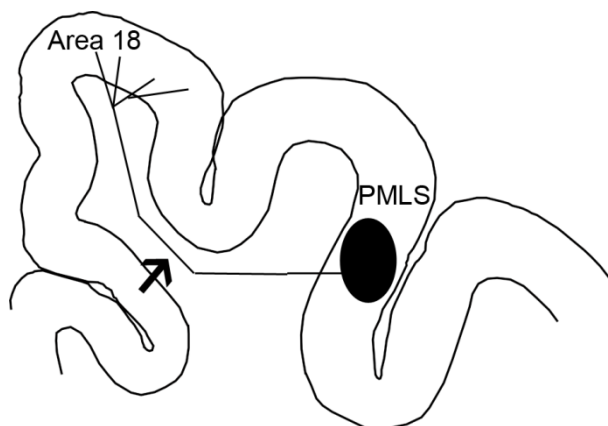
Da beim Start jeder Rekonstruktion nicht ersichtlich ist, ob das rekonstruierte Axonsegment in die gewünschte Zielregion zieht, wurde der Startpunkt jeder Axonrekonstruktion in der weißen Substanz ungefähr in der Mitte zwischen PMLS und dem



primären visuellen Kortex gesucht, da so die Wahrscheinlichkeit, ein Axon, das von PMLS nach Area 18 zieht, deutlich erhöht ist (Abb. 3.10, Pfeil).



**Abbildung 3.9:** Lichtmikroskopische Aufnahme der weißen Substanz mit BDA-gefärbten Fasern. Anhand der unterschiedlichen Faserdurchmesser sind gefärbte Feedback- (schwarze Pfeile) und Feedforward-Projektionen (graue Pfeile) erkennbar. Die Feedback-Projektionen haben einen geringeren Durchmesser ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) als die Feedforward-Projektionen ( $\sim 3 \mu\text{m}$ ). Der Maßstab beträgt  $50 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.10:** Schematische Zeichnung eines Koronarschnitts durch den visuellen Kortex der Katze. Die äußere Linie stellt die äußere Kontur des Gewebeschnittes dar und die innere Linie die Grenze zur weißen Substanz. Der Pfeil markiert den Startpunkt der Rekonstruktion. Die schwarze Ellipse markiert die Position der Tracerinjektion in PMLS. Zellen, die in der Injektionsstelle den Tracer BDA aufgenommen haben, wurden in ihrem axonalen Verlauf in den primären visuellen Kortex hinein rekonstruiert (dünne Linie).

Nachdem ein langes Axonsegment in einem Schnitt gefunden wurde, wurde auf die Oberfläche des Schnittes fokussiert und die Section neu angewählt und somit die Z-Achse auf die vorher definierte Oberfläche eingestellt. So konnte gewährleistet werden, dass die beim Aufziehen der Schnitte entstandenen Wellen oder Unebenheiten die Rekonstruktion nicht verfälschten. Das Axonsegment wurde im Folgenden in seiner gesamten Länge unter ständiger Nachfokussierung der Z-Achse bei 100 und 200facher Vergrößerung gezeichnet. Die entstandene Zeichnung wurde durch die Kontrolle über eine zusätzliche orthogonale Ansicht permanent kontrolliert. Nachdem die Zeichnung des kompletten Axonsegments in einem Schnitt vollendet war, wurden umliegende Fasersegmente ebenfalls mit ständiger Nachfokussierung der Z-Achse gezeichnet. Somit entstand ein genaues Abbild des Faserbildes in allen drei Dimensionen des Gewebes.

Um ein späteres Alignment mit den nächsten Schnitten innerhalb der Schnittserie zu ermöglichen, wurden weitere Strukturen des Schnittes nachgezeichnet. Zuerst wurden umliegende Blutgefäße und, wenn vorhanden, die Positionen der Markierungselektroden bei meist 100facher Vergrößerung nachgezeichnet. Um eine später dreidimensionale Darstellung des Gewebes zu ermöglichen, wurde im letzten Schritt die äußere Kontur des gesamten Schnittes bei 50facher Vergrößerung gezeichnet (Abb. 3.11).

Der nächste Schnitt in der Serie wurde dann in umgekehrter Reihenfolge mit dem gezeichneten Schnitt zur Deckung gebracht. Zuerst wurde die äußere Kontur über die Funktionen „Align Tracing“ oder/und „Rotate Tracing“ bei geringer Vergrößerung an die Kontur des neuen Schnittes angeglichen. Im nächsten Schritt wurde das gezeichnete Axonsegment bei höherer Vergrößerung in den Mittelpunkt des Zeichenfensters bewegt und die gezeichneten Blutgefäße und Faserfragmente an das aktuelle lichtmikroskopische Bild des neuen Schnittes bestmöglich angeglichen. Erst wenn mindestens 4 Faserfragmente und das Axonsegment im neuen Schnitt Anschlüsse hatten, die auch in der Z-Achse zu den vorherigen Zeichnungen passten, wurde das Alignment angenommen und das gefundene Axonsegment und die Faserfragmente im neuen Schnitt nachgezeichnet (Abb. 3.12). Danach erfolgte ebenfalls die Zeichnung der umliegenden Blutgefäße und abschließend die der äußeren Kontur.

Wenn kein Anschluss des Axons oder zu wenige Faserfragment im nächsten Schnitt wiedergefunden wurden, musste das Alignment überprüft werden und es mussten, wenn nötig, weitere Faserfragmente im vorausgegangenen Schnitt nachgezeichnet werden.

Wenn eine Rekonstruktion trotz vieler Alignmentpunkte im nächsten Schnitt nicht weitergeführt werden konnte, so musste die Rekonstruktion abgebrochen und ein neuer Startpunkt gesucht werden. Sofern die Rekonstruktion von einzelnen Terminalien eines

Axons nicht fortgesetzt werden konnte, wurde das entsprechende Ende in der Darstellung im Ergebnisteil mit einer Markierung (+) versehen.

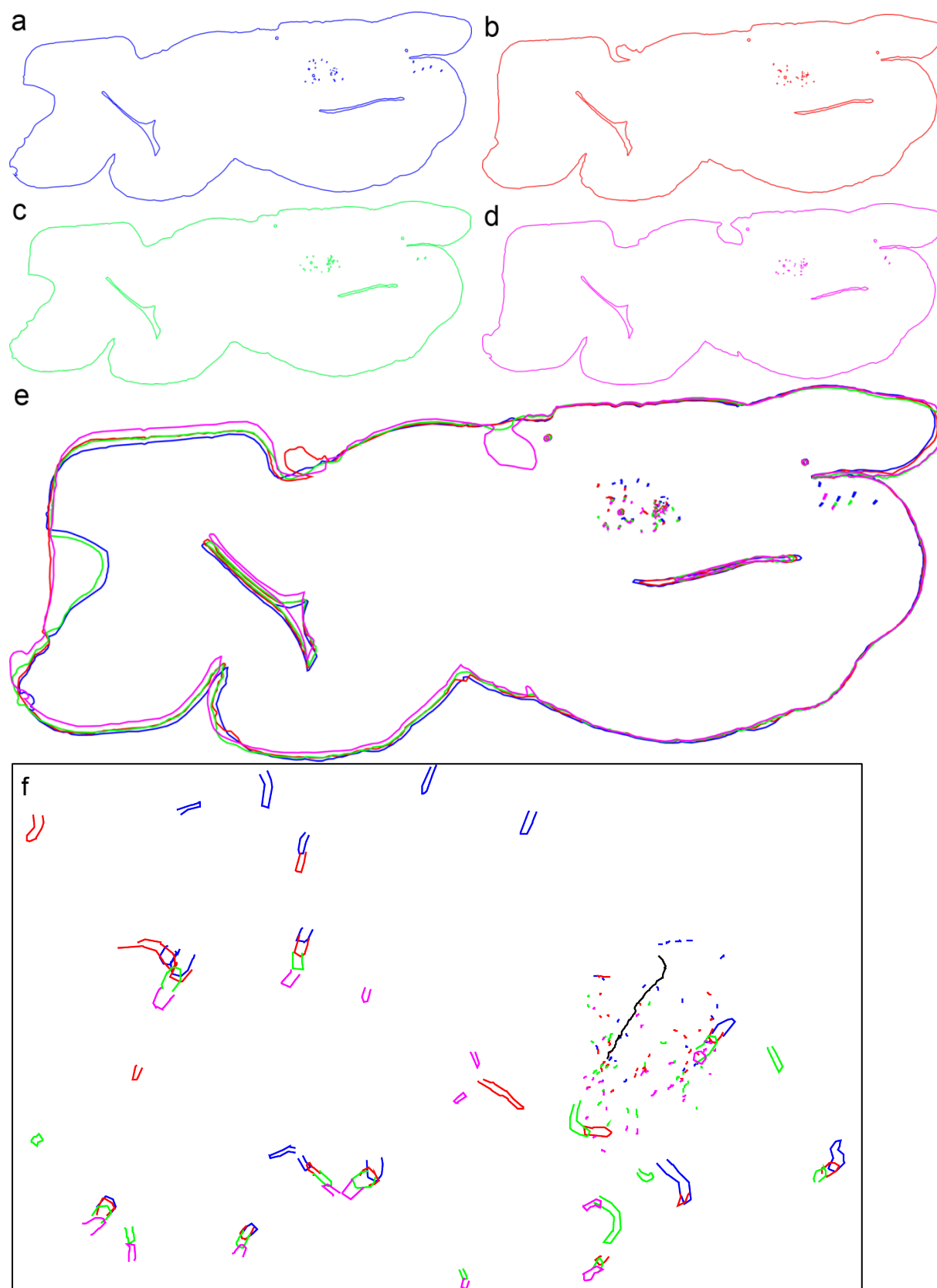
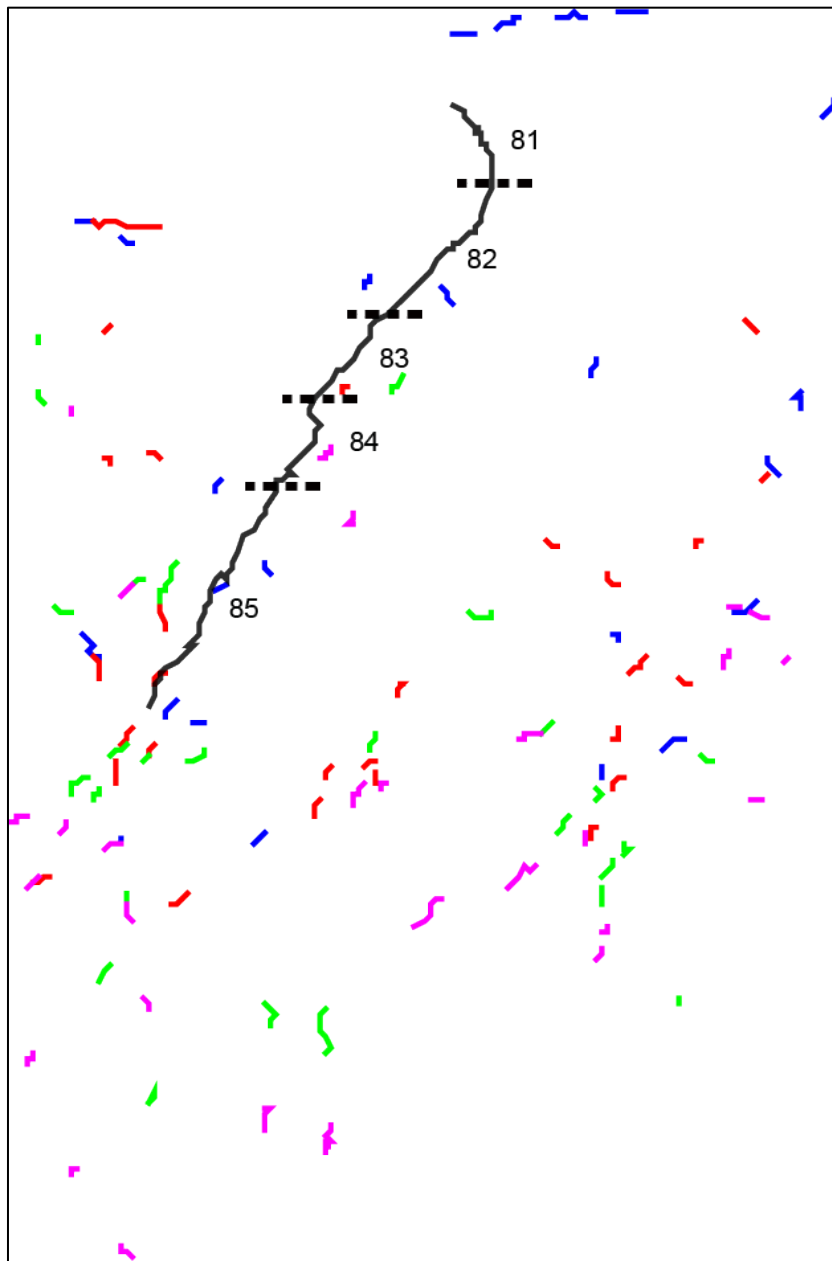


Abbildung 3.11

**Abbildung 3.11:** Darstellung der einzelnen Zeichenabläufe bei der Rekonstruktion von Axonsegmenten. Im ersten Teil (a bis d) sind die Konturen der einzelnen Schnitte separat dargestellt (a) Schnitt 82 b) Schnitt 83 c) Schnitt 84 d) Schnitt 85), wobei jeder Kontur eine Farbe zugewiesen wurde. Der Overlay dieser Schnitte (82 bis 85) ist in e dargestellt. In Bild f ist das komplette Alignment der Schnitte 82 bis 85 auf Ebene der Blutgefäße dargestellt. Dabei ist ein besonderes Augenmerk auf die Aneinanderreihung der gezeichneten Blutgefäße zu legen. Die Farbkodierung entspricht der Reihenfolge der Konturen (pink-grün-rot-blau). Das nachgezeichnete Axonsegment ist in schwarz und in höherer Vergrößerung in Abbildung 3.12 dargestellt.



**Abbildung 3.12:** Das gezeichnete Axonsegment aus der vorherigen Abbildung ist in schwarz dargestellt. Die Zahlen geben die Zugehörigkeit der einzelnen Axonsegmente zu den Schnittkonturen an und die gestrichelten Linien geben die Grenzen des Axons innerhalb der Schnitte an. Die Farbkodierung der übrigen Faserfragmente entspricht der Kodierung der vorherigen Abbildung.

Mit diesem Ablauf der Rekonstruktion wurden von der Gewebeserie von Katze 1 zwei komplette Axone und von Katze 4 drei komplette Axone gezeichnet.

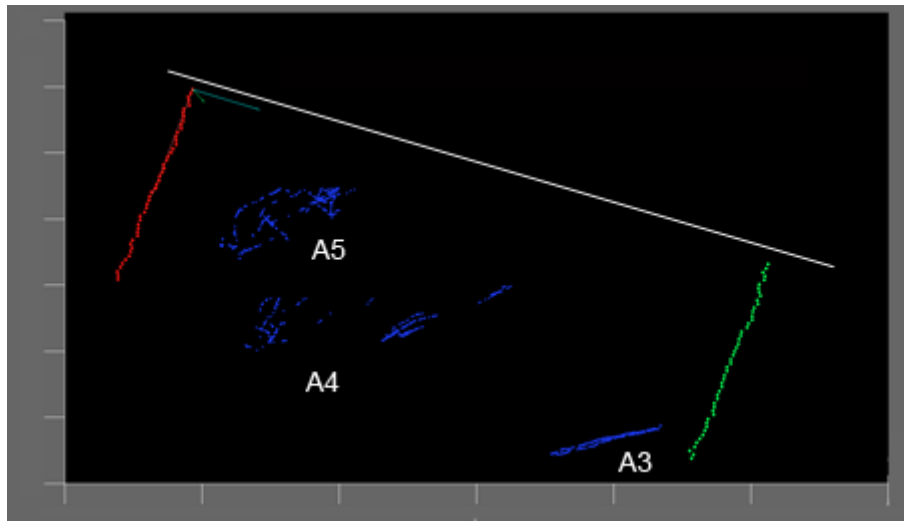
Die morphometrische Analyse der Axone erfolgte anschließend im Programm NeuroLucida Explorer. Die Analysen wurden zuerst für das komplette Axon durchgeführt und anschließend für die einzelnen Terminationsgebiete, die aufgrund ihrer räumlichen Abgrenzungen aufgeteilt wurden. Es wurden die Ausdehnungen der Axone und der einzelnen Terminationsfelder in alle Dimensionen bestimmt, die Gesamtlänge, die Gesamtflächen, die Anzahl an Verzweigungen, die Anzahl und Dichte an Boutons sowie deren Schichtzugehörigkeit.

#### **3.4.2.5 Überlagerung der rekonstruierten Axone mit den funktionellen Karten**

Für die drei rekonstruierten Axone von Katze 4 wurde eine Überlagerung mit der Orientierungskarte in Area 18 durchgeführt. Für die Zusammenführung der Axonrekonstruktionen und der funktionellen Karten wurden die vorhandenen Elektrodenmarkierungen benutzt. Diese Markierungen waren in der Gesamtrekonstruktion und über das Bild der Gefäßmuster auf der Kortexoberfläche auch in den funktionellen Karten vorhanden.

Ziel der Überlagerung war es, die physiologischen Eigenschaften der Zielbereiche der einzelnen Terminationsfelder der rekonstruierten Axone sichtbar zu machen. Dafür wurden die Koordinaten aller auf den rekonstruierten Axonen liegenden Boutons (nach räumlichen Terminationsgebieten getrennt) und die Koordinaten der Referenzmarkierungen mit dem NeuroLucida Explorer exportiert (Rochefort et al., 2009) und in MatLab in ein dafür geschriebenes Analyseprogramm importiert (ebenfalls von Constantin Rothkopf, TU Darmstadt, Fachbereich Humanwissenschaften). Mit diesem Programm wurde die Auflösung der Winkelkarte an die der Rekonstruktionen angepasst, indem die Winkelkarte entsprechend der Referenzmarkierungen geschrumpft wurde (Abb. 3.13). Da die Schnittebene des Gewebes nicht parallel zur Kameraebene lag, musste die Winkelkarte anhand der Referenzmarkierungen durch die Rekonstruktion bewegt werden um den Boutons die entsprechenden Orientierungspräferenzen zuzuordnen zu können. Dadurch konnten ebenfalls Ungenauigkeiten, die durch unterschiedliche partielle Schrumpfungen der Gewebeschnitte entstanden waren, ausgeglichen werden. Die so erhaltene Orientierungswinkel-Zuordnung der Boutons wurde danach statistisch mit MatLab ausgewertet. Dafür wurde die Anzahl der Boutons pro Orientierung mit einer Rasterung („binning“) von  $10^\circ$  zusammengefasst und prozentual jeweils für das gesamte Terminationsfeld und nach Schichten getrennt dargestellt (Karube and Kisvarday, 2011). Aufgrund seiner sehr medialen Lage in der Hemisphäre lag das Terminationsgebiet T2 von Axon 4 in einem Bereich, der bei der Aufnahme der funktionellen Karten durch die Reste der

Dura mater, die über den Sinus venosus vorhanden waren, verdeckt wurden. So konnte diesem Ausschnitt keine spezifischen funktionellen Eigenschaften zugeordnet werden und das Terminationsgebiet T2 von Axon 4 musste von der Analyse ausgeschlossen werden.



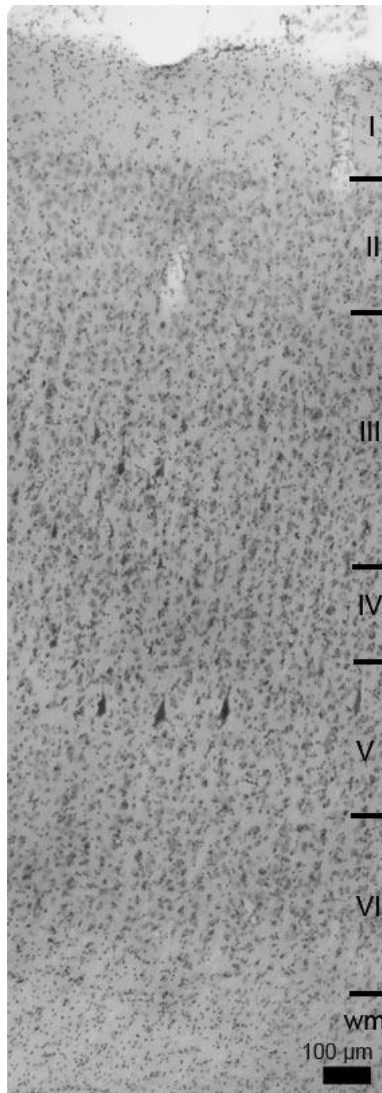
**Abbildung 3.13:** Darstellung der Boutons (blaue Punkte) und der Referenzmarkierungen (rote und grüne Punkte) in einer orthogonalen Ansicht im programmierten Koordinatensystem. Die Lage der Winkelkarte ist durch die weiße Linie dargestellt. Die Boutons gehören zu den Axonen 3 bis 5 (A3 bis A5).

### 3.4.2.6 Kortikalen Schichtung von PMLS, Area 17 und Area 18

Für die zytoarchitektonische Bestimmung der Zielregionen wurden die Gewebeschnitte nach Abschluss der Rekonstruktionsarbeiten und der vollständigen Auswertung der Fluoreszenzsignale mit der Nissl-Färbung gegengefärbt. Diese Färbung ermöglicht eine Bestimmung des jeweiligen Areals unter zur Hilfenahme der entsprechenden Literatur. Für die Fluoreszenzauswertung musste PMLS bestimmt werden, für die Position der Terminationsgebiete der rekonstruierten Axone die Areale 17 und 18. Die makroskopische Zuordnung der Areale erfolgte anhand der Vorgaben von Woolsey (Woolsey, 1981).

#### 3.4.2.6.1 Posteromedialer Teil des lateralen suprasylvischen Areals

PMLS befindet sich auf dem postero-medial gelegenen Abschnitt des lateralen suprasylvischen Sulcus. Die Arealbestimmung und die Bestimmung der kortikalen Schichten erfolgten unter Verwendung der Beschreibungen von Sanides und Hoffmann (Sanides and Hoffmann, 1969) und Payne (Payne et al., 1991) (Abb. 3.14).



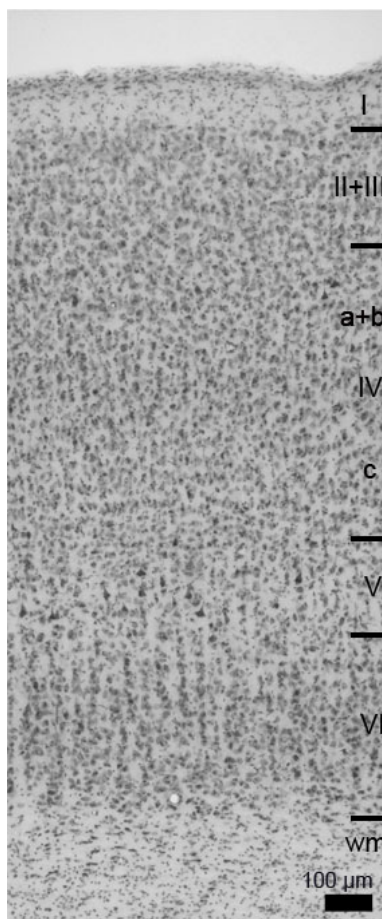
**Abbildung 3.14:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Nissl-Färbung vom PMLS. Die Grenzen der Kortexschichten sind mit schwarzen Balken angedeutet und mit römischen Zahlen (I bis VI) gekennzeichnet. Die Grenze zur weißen Substanz (wm) ist ebenfalls mit einem Balken markiert. Die zytoarchitektonische Unterschiede der einzelnen Schichten werden ausführlich im Text beschrieben. Der Maßstab beträgt 100 µm.

In Schicht I befinden sich sehr wenige Neurone, nur Gliazellen sind erkennbar. Die Abgrenzung zu Schicht II erfolgt durch eine starke Zunahme von gefärbten Zellen. Die Grenze zwischen Schicht II und III ist nicht so klar erkennbar wie die Grenze zwischen Schicht I und II. Schicht III zeichnet sich aber durch das Vorhandensein von größeren Somata der Zellen aus. In der unteren Hälfte von Schicht III sind stark gefärbte Pyramidenzellen sichtbar, welche auch die Grenze zu Schicht IV markieren. Diese Schicht lässt sich durch das Fehlen von Pyramidenzellen charakterisieren. Schicht V enthält dagegen sehr große, dunkelgefärbte Pyramidenzellen. Die Zelldichte in dieser Schicht ist geringer als in den anderen Schichten in PMLS. Die Abgrenzung zu Schicht VI erfolgt durch die Zunahme der Zelldichte und dem Vorhandensein von fusiformen, intensiv gefärbten Zellen. Die Grenze zur weißen Substanz ist durch die abrupte Abnahme der Zelldichte erkennbar.

#### 3.4.2.6.2 Area 17

Area 17 oder Area striata zeichnet sich durch folgende Schichtmerkmale aus. Schicht I ist dünner als in Area 18 und 19 und der Übergang zu Schicht II wird durch die Zunahme in der Zelldichte deutlich. Schicht II und Schicht III sind nur schwer voneinander trennbar, da sie

beide sehr dünn und miteinander verschmolzen sind. Eine regelmäßige Verteilung von Körnerzellen und kleinen Pyramidenzellen lässt sich beobachten. Schicht IV lässt sich in drei Bereiche unterteilen: IV a und IV b enthalten nur wenige kleine Körnerzellen und große Sternzellen. IV c dagegen enthält mehr kleine Körnerzellen als IV a und b, jedoch weniger Sternzellen. Der Übergang von IV b zu IV c fällt nur durch die Verdichtung der Körnerzellen auf. In Schicht V befinden sich nur wenige große Pyramidenzellen mit breiter Basis und kleine Pyramidenzellen. Die Pyramidenzellen zeigen keine bevorzugte Lageorientierung und sind unregelmäßig verteilt. Schicht VI ist sehr breit und stark gefärbt. Multi- und fusiforme Zellen sind dicht zu Säulen in Richtung der radiären Fasern angeordnet. Die Grenze zur weißen Substanz ist ebenfalls durch die abrupte Abnahme der Zelldichte erkennbar (Abb. 3.15) (Otsuka and Hassler, 1962).



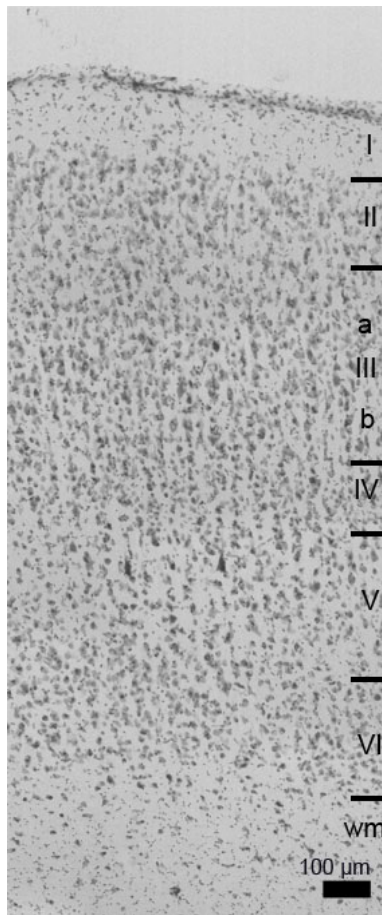
**Abbildung 3.15:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Nissl-Färbung von Area 17. Die Grenzen der Kortexschichten sind mit schwarzen Balken angedeutet und mit römischen Zahlen (I bis VI) gekennzeichnet. Die Grenze zur weißen Substanz (wm) ist ebenfalls mit einem Balken markiert. Die zytoarchitektonischen Unterschiede der einzelnen Schichten werden ausführlich im Text beschrieben. Der Maßstab beträgt 100 µm.

#### 3.4.2.6.3 Area 18

Der Übergang von Schicht I zu Schicht II zeichnet sich in Area 18 oder Area occipitalis ebenfalls durch eine starke Zunahme in der Zelldichte aus. Schicht II ist schmal und locker aufgebaut und lässt sich gut von Schicht III unterscheiden. Diese ist sehr gut entwickelt und dicker als in Area 17. Sie lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: Schicht III a enthält kleine und mittelgroße Pyramidenzellen und III b große bis kleine Pyramidenzellen, welche keine besondere Lagerung aufweisen. Schicht IV ist locker aufgebaut und enthält relativ große Körnerzellen. In Schicht V nimmt die Zelldichte ab und es kommen nur wenige große



Pyramidenzellen vor. Schicht VI ist gut entwickelt, aber deutlich dünner und weniger dicht und dunkler als Schicht VI in Area 17 (Abb. 3.16) (Otsuka and Hassler, 1962).



**Abbildung 3.16:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Nissl-Färbung von Area 18. Die Grenzen der Kortexschichten sind mit schwarzen Balken angedeutet und mit römischen Zahlen (I bis VI) gekennzeichnet. Die Grenze zur weißen Substanz (wm) ist ebenfalls mit einem Balken markiert. Die zytoarchitektonische Unterschiede der einzelnen Schichten werden ausführlich im Text beschrieben. Der Maßstab beträgt 100 µm.

### 3.4.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung erfolgt mit von Constantin Rothkopf geschriebenen Programmen in MatLab, mit Microsoft Excel und mit dem Programm Statview (Abacus Software).

Um festzustellen, ob die Unterschiede der Zellgrößen der Neurone in PMLS signifikant waren, wurden zuerst Histogramme der einzelnen Populationen erstellt und anschließend mit dem Mann-Whitney-U Test getestet (Mann and Whitney, 1947). Es handelt sich bei diesem Test um einen parameterfreien statistischen Test, der für den Vergleich von unabhängigen Stichproben aus zwei Gruppen geeignet war. P-Werte kleiner als 5% wurden als signifikant gewertet. Signifikante Unterschiede wurden mit „\*“ gekennzeichnet und die ermittelten P-Werte sind im Anhang aufgelistet.

## 4 ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Arbeit war es, die bekannten neuroanatomischen Projektions- und Verbindungsmuster zwischen dem primären visuellen Kortex und dem am Bewegungssehen beteiligten PMLS auf der Ebene einzelner Neurone und Axone zu analysieren. Für die Visualisierungen von sehr feinen strukturellen Merkmalen von Neuronen erwiesen sich die in dieser Studie gewählten intrazellulären Tracer mit Dextran als Grundkomponente als gut geeignet. Diese Tracer, mittels Druckinjektionen in vorher festgelegte Gewebereiche in Area 18 und in PMLS injiziert, ließen die vorhandenen Verbindungen sichtbar werden.

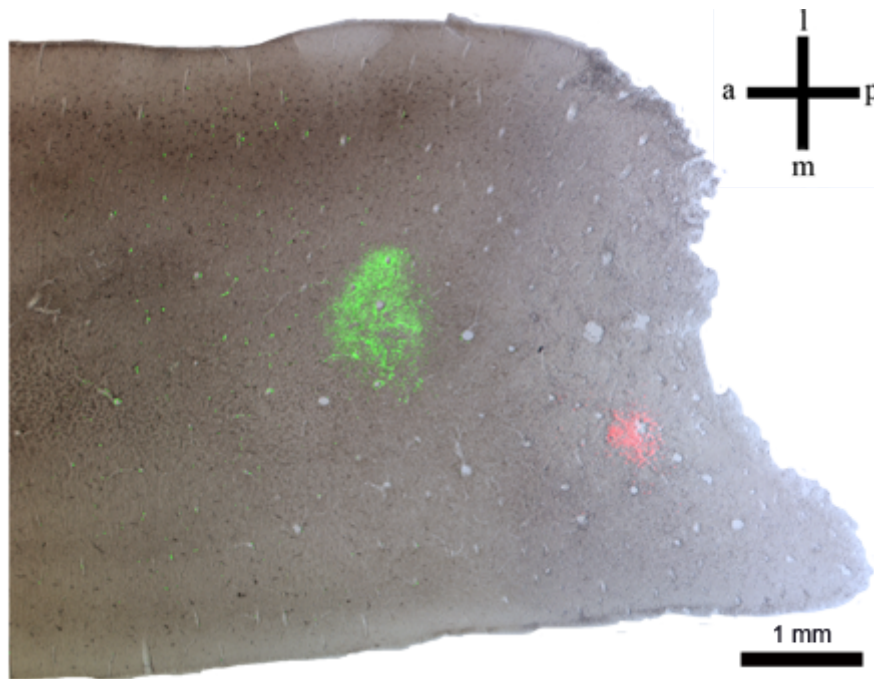
Die Injektionen in Area 18 markierten retrograd Neurone in PMLS, die ihre Projektionen zu den verschiedenen Injektionsstellen aussandten. Mit diesem Ansatz konnten Rückschlüsse auf die funktionelle Anordnung der Neurone in PMLS gezogen werden.

Die Injektionen in PMLS dienten als Ausgangspunkt für die Rekonstruktion von einzelnen Axonen von PMLS in den primären visuellen Kortex. Durch die Eigenschaften von Dextran in antero- und retrograde Richtung innerhalb des Neurons und seiner filigranen Projektionen zu diffundieren, konnten so insgesamt fünf Neurone in ihrer komplexen Ausdehnung rekonstruiert werden. Den Axonen dieser Neurone konnten die funktionellen Eigenschaften der Zielregionen über das Alignment mit den funktionellen Karten zugeordnet werden.

### 4.1 INJEKTIONEN IN AREA 18

Die Tracerinjektionen in Area 18 wurden in zwei räumlich voneinander getrennte Bereiche injiziert. Der Tracer Dextran konjugiert mit Fluorescein wurde in einen Bereich injiziert, der vertikale Stimuli präferierte und der Tracer Dextran konjugiert mit Tetramethylrhodamin in einen der horizontale Stimuli präferierte (Abb. 3.2). Die Injektionsstellen hatten bei Katze 4 einen Abstand von ~1,6 mm und bei Katze 5 von ~2,2 mm zueinander (Abb. 4.1).

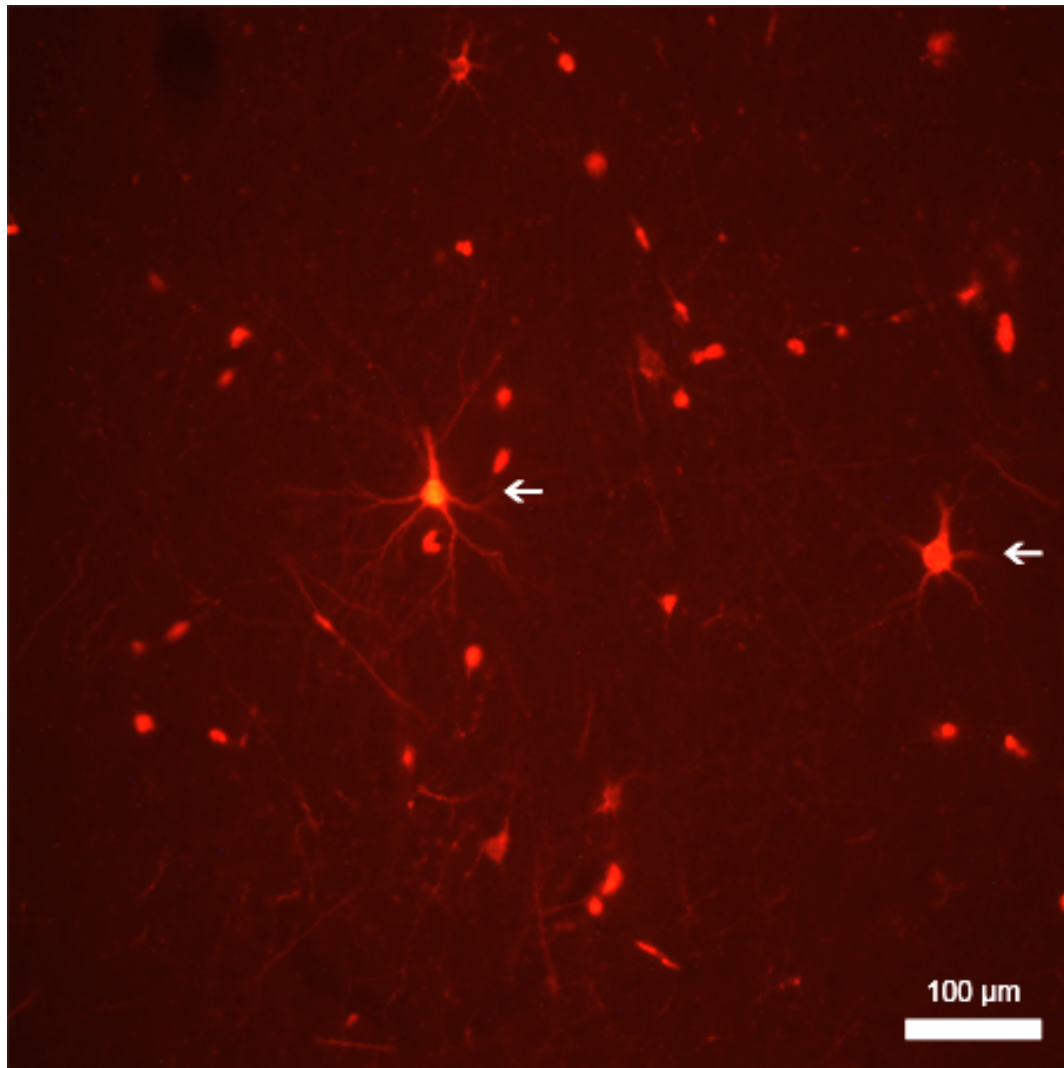
Die fluoreszierenden Dextrane wurden von der Injektionsstelle in retrograder Richtung (in Richtung des Zellkörpers) innerhalb der Neurone transportiert und machten so unter anderem die Positionen vom Neurone in PMLS und im Corpus geniculatum laterale (CGL) sichtbar. Die Neurone in PMLS wurden unter Betrachtung der laminaren Verteilung und der unterschiedlichen Zellkörpergrößen analysiert. Die Positionen der Neurone im CGL wurden für die Zuordnung der Repräsentation des visuellen Feldes in den unterschiedlichen Schichten und Positionen innerhalb einer Schnittserie analysiert.



**Abbildung 4.1:** Projektion der Injektionsstellen von Fluorescein (grün) und Tetramethylrhodamin (rot) auf einen schwachbeleuchteten horizontalen Gewebeschnitt von Katze 5 bei einer Schnitttiefe von 1800  $\mu\text{m}$ . Der Maßstab beträgt 1 mm (a: anterior, m: medial, l: lateral, p: posterior, v: ).

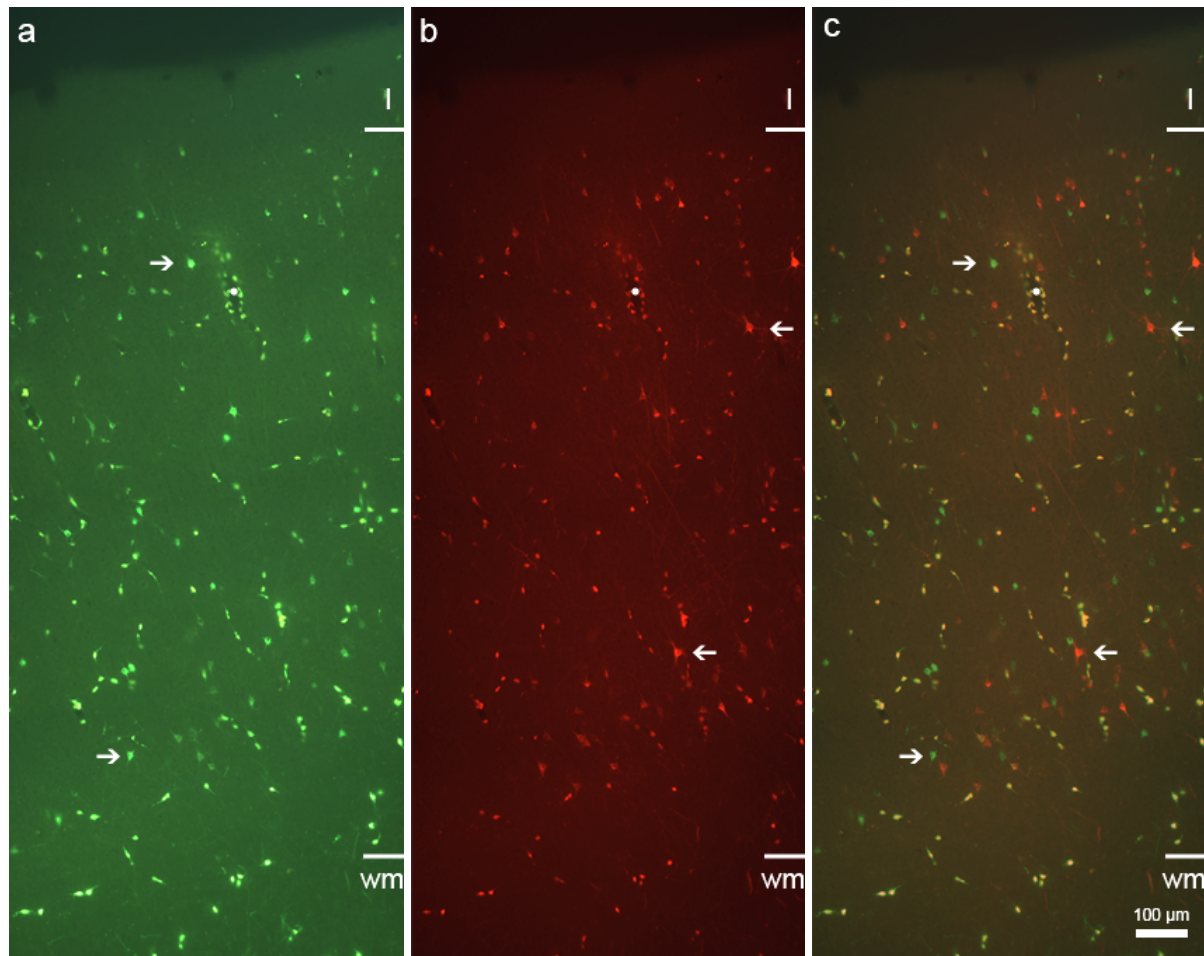
#### 4.1.1 RETROGRAD MARKIERTE NEURONE IN PMLS

Nach der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte von Katze 4 und Katze 5 wurden die angefertigten Horizontalschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtern betrachtet. Zuerst wurde in beiden Fällen sichergestellt, dass die Injektionsstellen auf den Rindenbereich beschränkt waren und nicht die weiße Substanz kontaminiert hatte. Allerdings wurde bereits bei dieser ersten Analyse ersichtlich, dass die Injektionen von Dextran konjugiert mit Fluorescein zu einer größeren Ausdehnung der Injektion innerhalb des Gewebes bei beiden Katzen geführt hatten als die von Tetramethylrhodamin konjugierten Dextranen (Abb. 4.1). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Anzahl von retrograd markierten Neuronen, die Fluorescein enthielten, größer war als die Anzahl Tetramethylrhodamin markierten Neurone. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Injektionen die gewünschte vollständige Färbung der Zellgestalten in PMLS und im CGL hervorgerufen hatten. Bei der Durchsicht der Gewebeschnitte wurde auch diese Erwartung erfüllt, bei der Betrachtung der Fluoreszenzsignale von Fluorescein und Tetramethylrhodamin konnten Neurone gefunden werden, deren Zellkörper und Dendritenbaum vollständig sichtbar waren (Abb. 4.2).



**Abbildung 4.2:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Neuronen, die den Tracer Tetramethylrhodamin enthalten. Die Tracerinjektion führt zu einer vollständigen Füllung des Zellkörpers und seiner Dendriten (weiße Pfeile) in PMLS. Der Maßstab beträgt 100 µm.

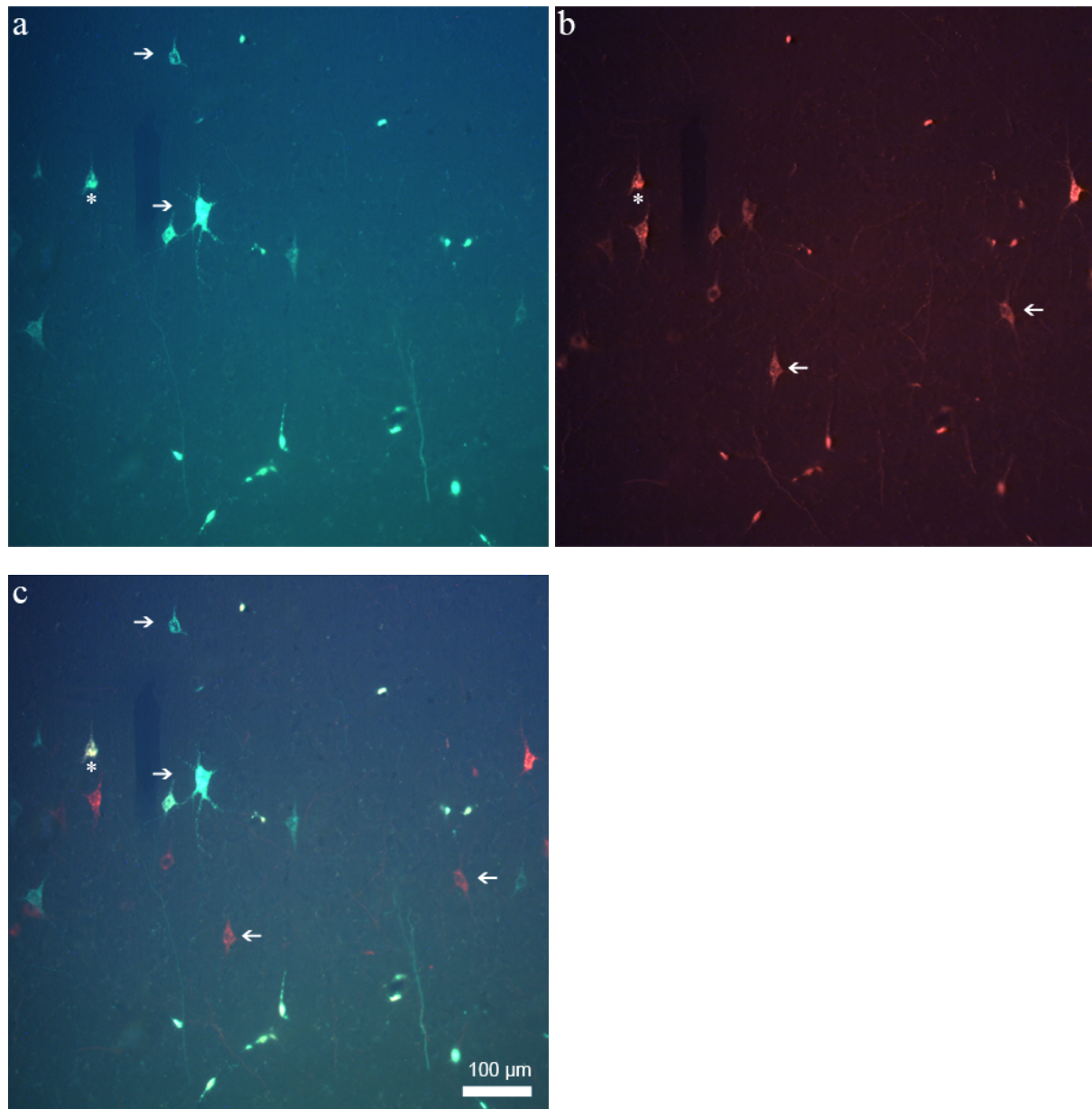
Im Folgenden wurden die Gewebeserien systematisch untersucht und, wie im Methodenteil beschrieben, ausgewertet. Jeder Gewebeschnitt wurde über die komplette Ausdehnung des PMLS und über alle kortikalen Schichten hinweg auf das Vorhandensein von markierten Neuronen untersucht (Abb. 4.3).



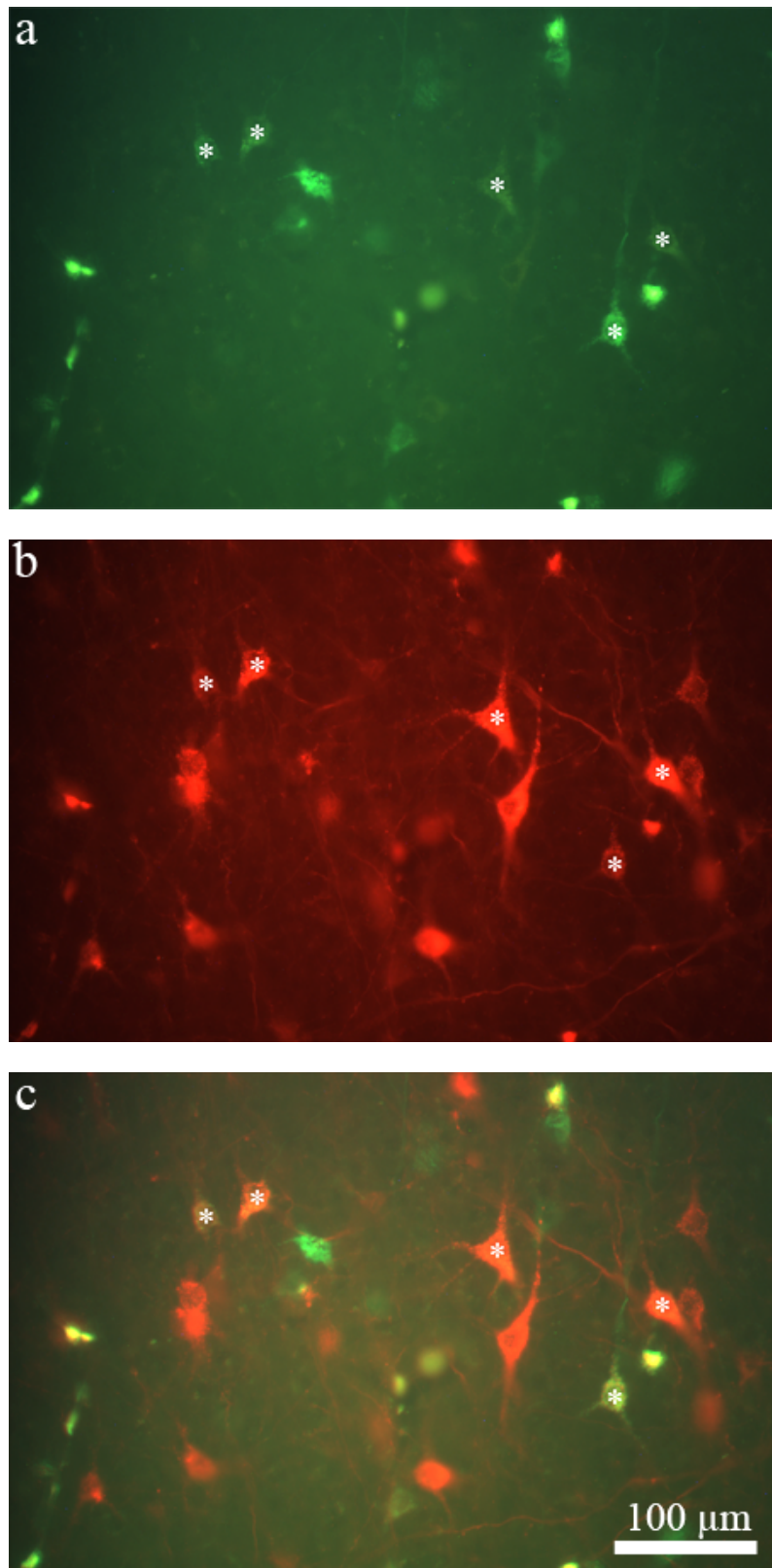
**Abbildung 4.3:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme über alle Schichten von PMLS. **a)** Übersicht über die markierten Zellkörper mit Fluorescein **b)** Übersicht über die markierten Zellkörper mit Tetramethylrhodamin **c)** Overlay von a und b. Die Grenze zur weißen Substanz ist unten rechts mit dem schmalen Balken markiert und auf der Seite der weißen Substanz ist die Beschriftung wm eingefügt. Der weiße Punkt deutet ein markantes Blutgefäß in allen drei Bildern an. Die Pfeile in a und b markieren jeweils markierte Zellkörper und befinden sich ebenfalls im Overlay. Der Maßstab in c gilt ebenfalls für a und b und beträgt 100 µm.

Es wurden bei Katze 4 insgesamt 4072 Neurone und bei Katze 5 insgesamt 10207 Neurone gefunden, die sich über die Schichten II bis VI verteilten. Die Populationen ließen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe bestand jeweils aus Neuronen, die selektiv zur Injektionsstelle nur Fluorescein oder Tetramethylrhodamin enthielten. Die zweite Gruppe bildeten Neurone, die unselektiv beide Farbstoffe enthielten und somit Projektionen zu beiden Injektionsstellen unterhielten (Abb. 4.4 und Abb. 4.5). Der Anteil dieser Neurone betrug bei Katze 4 insgesamt 14% und bei Katze 5 insgesamt 7%. Die genaue Gruppenverteilung der Neurone befindet sich im Anhang (Kap. 8.7.1).





**Abbildung 4.4:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Schicht III in PMLS. Das Neuron, das beide Tracer enthält, ist mit einer Markierung (\*) gekennzeichnet. **a)** Ausschnitt von markierten Neuronen mit Fluorescein **b)** Ausschnitt von markierten Neuronen mit Tetramethylrhodamin **c)** Overlay von a und b. Die Pfeile in a und b markieren jeweils markierte Neurone und befinden sich ebenfalls im Overlay. Der Maßstab gilt für alle Bilder und beträgt 100 µm.

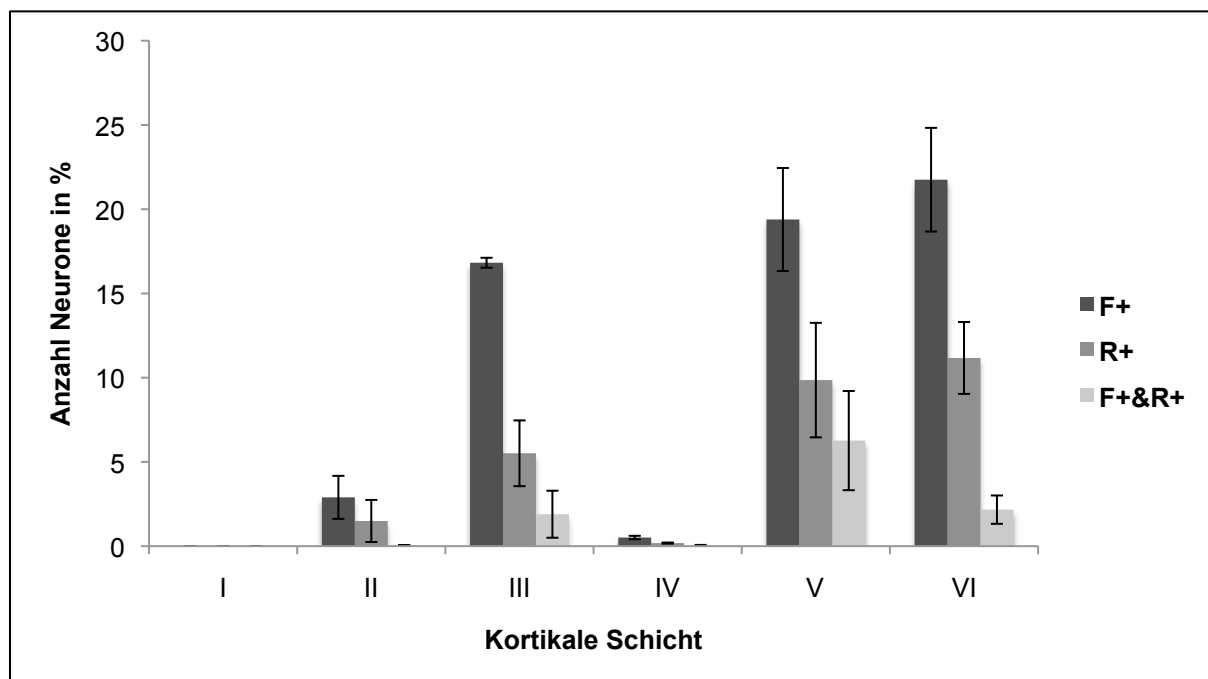


**Abbildung 4.5:** Fluoreszenzmikroskopische Detailaufnahme aus Schicht V. Neurone, die beide Tracer enthalten, tragen eine Markierung (\*). **a)** Markierte Neurone mit Fluorescein **b)** Markierten Neurone mit Tetramethylrhodamin **c)** Überlagerung von a und b. Der Maßstab gilt für alle Bilder und beträgt 100 µm.

Nachdem alle Gewebeschnitte einer Serie mit dem Programm Neurolucida dokumentiert worden waren und die genauen Positionen der Neurone aus allen Gruppen

mittels Markern festgehalten worden waren und zusätzlich die Somagröße der verschiedenen Neuronengruppen stichprobenartig festgehalten wurde, erfolgte die Färbung mit Kresylviolett um die kortikale Schichtung zu bestimmen. So konnte für jedes markierte Neuron die Zugehörigkeit zu einer kortikalen Schicht bestimmt werden.

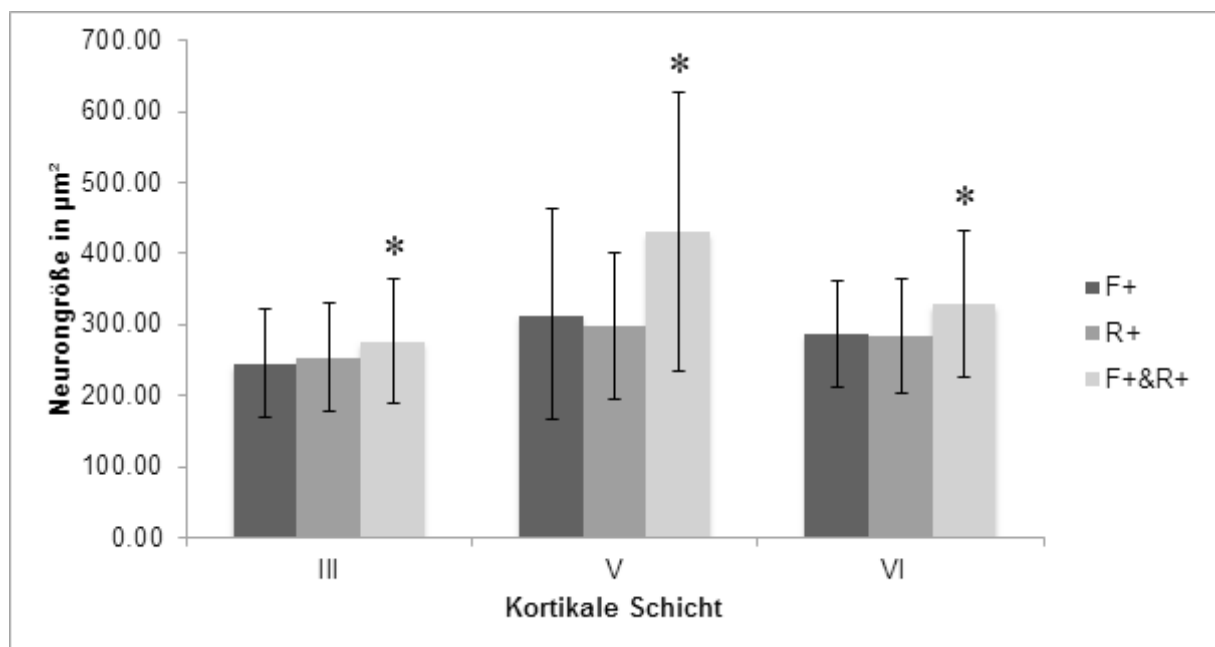
Insgesamt wurden bei Katze 4 und 5 nach vorher festgelegten Kriterien 14279 Neurone markiert und 2497 Somaflächen bestimmt. Die markierten Neurone befanden sich in den Schichten II bis VI, wobei der Anteil in den infragranulären Schichten (70%) höher war als in den supragranulären Schichten (29%). In Schicht IV befanden sich insgesamt nur 98 Neurone (1%). Der Anteil an mit Fluorescein markierten Neuronen lag mit 61% mehr als doppelt so hoch wie der entsprechende Anteil an mit Tetramethylrhodamin markierten Neuronen (28%). Dieser Unterschied konnte auf die größeren Injektionsstellen von Fluorescein und auf die besseren Laufeigenschaften des Tracers zurückgeführt werden. Die Neurone, die beide Tracer enthielten befanden sich in den Schichten II, III, V und VI. Hierbei lag der größte Anteil der Neurone in Schicht V (714 Neurone entsprechen 6% aller gefundenen Neurone). In Schicht VI befanden sich 361 Neurone (2%), in Schicht III 185 Neurone (2%) und in Schicht II insgesamt nur 8 Neurone. Die absoluten Verteilungswerte befinden sich im Anhang (Abb. 4.6).



**Abbildung 4.6:** Prozentuale Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS. Es wird nach kortikaler Schicht (I bis VI) und nach enthaltenem Tracer unterschieden (F+= Fluorescein positiv, R+= Tetramethylrhodamin positiv, F+&R+= Fluorescein und Tetramethylrhodamin positiv). Die markierten Neurone befinden sich in den Schichten II bis VI. Der Anteil in den infragranulären Schichten ist höher als in den supragranulären Schichten. Die Neurone, die beide Tracer enthalten (F+&R+) befinden sich vorwiegend in Schicht V. Die Injektionen von Dextran konjugiert mit Fluorescein markierte aufgrund der größeren Injektionsstelle in beiden Fällen eine höhere Anzahl von Neuronen. Als Fehlerbalken aufgetragen ist der Standardfehler (n= 14279).



Die Analyse der Neurongröße der umrandeten Zellen erfolgte für die kortikalen Schichten III, V und VI. Die Zellen aus Schicht IV wurden aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht einbezogen. Die Neurone aller Gruppen hatten in Schicht III einen kleineren Zellkörper als in Schicht V und VI. Innerhalb von Schicht III hatte aber die Gruppe der unselektiv markierten Neurone (F+&R+) einen signifikant größeren Zellkörper (Mann-Whitney-U Test,  $p=0,0006$  und  $0,0337$ ). Innerhalb von Schicht V hatten die selektiv markierten Neurone eine Somafläche von  $\sim 300 \mu\text{m}^2$  und die unselektiv markierten Neurone unterschieden sich mit einer durchschnittlichen Neurongröße von  $430 \mu\text{m}^2$  signifikant davon (Mann-Whitney-U Test,  $p= <0,0001$ ). In Schicht VI zeigten sich ähnliche Tendenzen, wobei die unselektiv markierten Neurone hier nur eine durchschnittliche Somagröße von  $330 \mu\text{m}^2$  hatten, sich aber dennoch signifikant von den selektiv markierten Neuronen unterschieden (Mann-Whitney-U Test,  $p=<0,0001$ ) (Abb. 4.7).

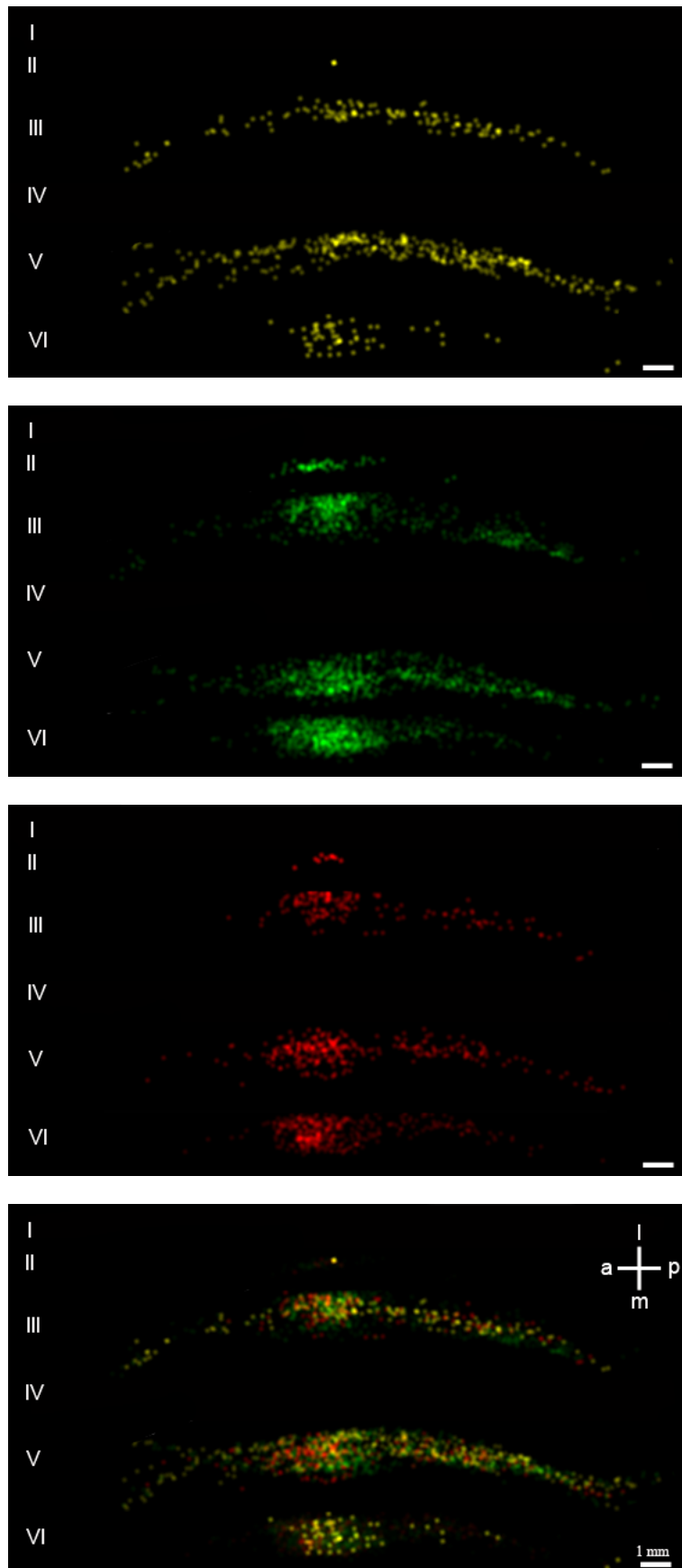


**Abbildung 4.7:** Verteilung der durchschnittlichen Somaflächen der retrograd markierten Neurone in PMLS pro kortikaler Schicht und enthaltenen Tracer (F+= Fluorescein positiv, R+= Tetramethylrhodamin positiv, F+&R+= Fluorescein und Tetramethylrhodamin positiv). Die unselektiv markierten Neurone haben in allen Schichten eine signifikant größere Somafläche im Vergleich zu den selektiv markierten Neuronen ( $n= 2497$ ). Als signifikant wurden Werte angenommen, die beim Mann-Whitney-U Test unter 5% lagen (Fehlerbalken: Standardabweichung).

Für die Betrachtung der räumlichen Verteilung der Neurone über die komplette Ausdehnung des PMLS wurden die Koordinaten jedes Neurons mit der Information seiner Schichtzugehörigkeit und des enthaltenen Tracers in MatLab eingelesen, normalisiert und die Verteilung der Zellen im Raum pro Schicht für jeden Marker einzeln und abschließend für alle Marker zusammen dargestellt. Für diese Art der Betrachtung konnten die erhaltenen Daten der beiden Experimente aufgrund der unterschiedlichen absoluten anatomischen

Ausdehnungen des Areales PMLS nicht zusammengefasst werden. In Abbildung 4.8 wurde die Verteilung der Neurone in Katze 4 dargestellt und in Abbildung 4.9 die Verteilung in Katze 5. Im oberen Bild sind alle Neurone dargestellt, die beide Tracer (Fluorescein und Tetramethylrhodamin (F+&R+)) enthalten. Im zweiten Bild wurden alle mit Fluorescein markierten Neurone (F+) und im dritten Bild alle Tetramethylrhodamin markierten Neurone (R+) aufgetragen. Das untere Bild stellt den Overlay von allen drei vorher gezeigten Neuronenpopulationen dar.

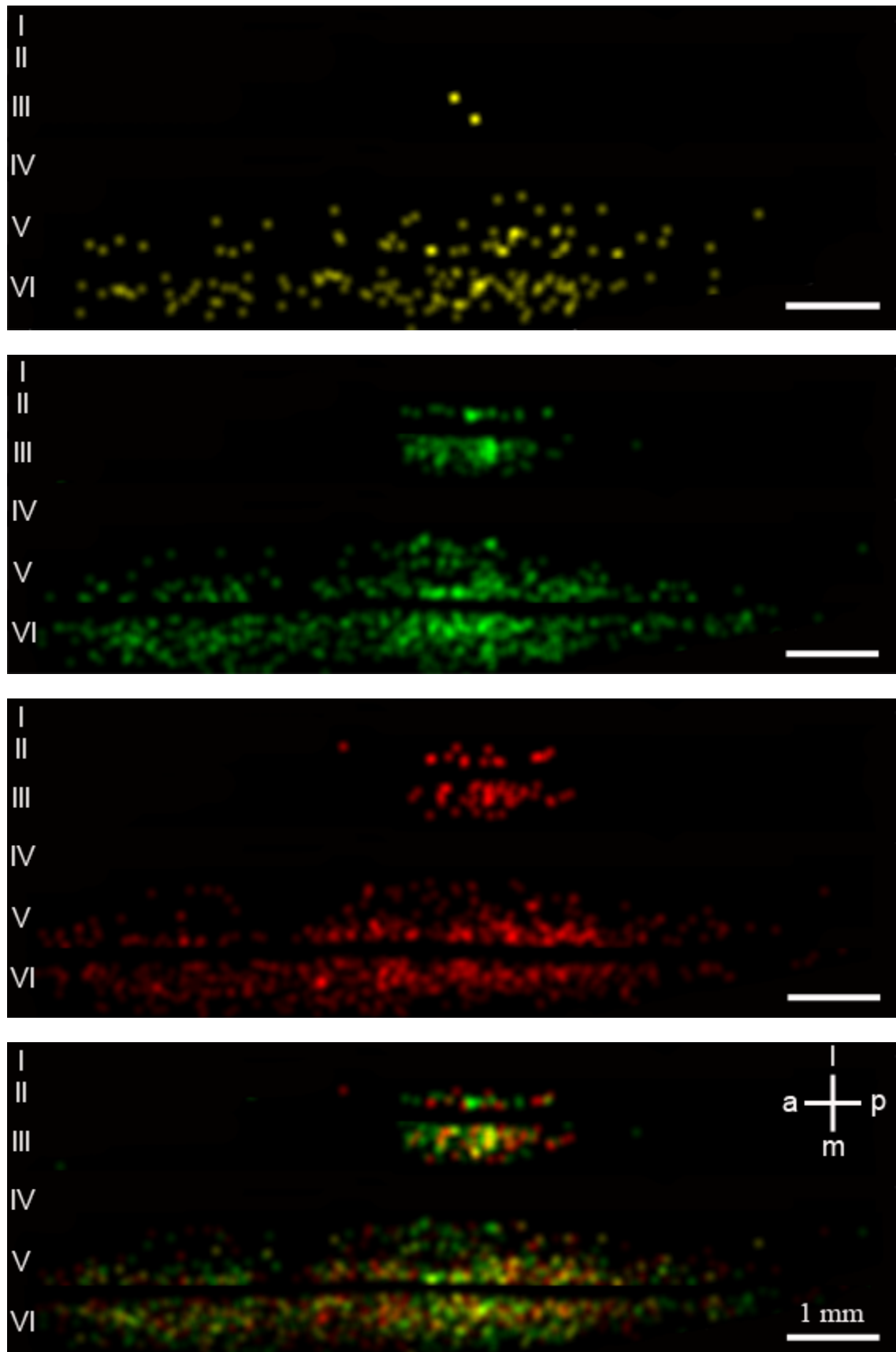
Für die räumliche Auftragung wurden bei Katze 4 insgesamt 4072 Neurone aus den Schichten II bis VI verwendet (Abb. 4.8). In Schicht I wurden keine Neurone gefunden. Es waren insgesamt 567 unselektiv markierten Neurone über alle Schichten vorhanden, die sich in Schicht III (n=134) und in Schicht V (n=375) über die komplette Ausdehnung des Areals erstreckten. In Schicht II (n=1) und Schicht IV (n=3) wurde nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen gefunden, die sich aber im gleichen Arealabschnitt wie die Neurone aus Schicht VI (n=54) befanden. Die selektiv markierten Neurone, die Fluorescein enthielten, stellten die größte Neuronenpopulation dar (n=2713). Diese Neuronen verteilten sich in den Schichten III, V und VI gleichmäßig über die komplette Ausdehnung des Areals mit einer Verdichtung der Neurone in der Mitte des Areals. Diese Verdichtung der Neurone hatte eine Ausdehnung in diesen Schichten in a-p-Richtung von ~ 3 mm. Ein sehr ähnliches Verteilungsmuster wurde für die Neurone gefunden (n=792), die den Tracer Tetramethylrhodamin enthielten. In der Projektion aller Neuronenpopulationen zusammen wurde der Schwerpunkt der Injektion ungefähr in der Mitte des Areals sichtbar. Die Verdichtung der Neurone grenzte sich mit einer Breite von ~2,1 mm über alle beteiligten Schichten von der breiten Streuung der Neurone in den Schichten III und V ab.



**Abbildung 4.8:** Räumliche Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS von Katze 4 nach kortikalen Schichten aufgeteilt. Im oberen Bild sind alle Neurone dargestellt, die die Tracer Fluorescein und Tetramethylrhodamin enthalten (F+&R+), im zweiten Bild alle

Fluorescein-positiven Neurone (F+), im dritten Bild alle Tetramethylrhodamin-positiven Neurone (R+). Das untere Bild stellt die Überlagerung von allen drei vorher gezeigten Neuronenpopulationen dar. Der Maßstab beträgt 1 mm in a-p-Richtung, in l-m-Richtung wurden die Abstände der Schichten so zueinander vergrößert, dass keine Überlappung der Schichten vorkam (a: anterior, m: medial, l: lateral, p: posterior).

Für die räumliche Verteilung der Neurone in PMLS von Katze 5 standen insgesamt 10207 Zellen in den Schichten II bis VI zur Verfügung. Die Gruppe der unselektiv markierten Neurone enthielt 704 Zellen, die sich in den Schichten V (n=339) und VI (n=307) gleichmäßig über das komplette Areal verteilten (Abb. 4.9). In den supragranulären Schichten befanden sich nur sehr wenige Neurone (n=58), die sich konzentriert an zwei Positionen befanden. In den Schichten I und IV wurden keine Zellen gefunden. Die selektiv markierten Neurone, die Fluorescein oder Tetramethylrhodamin enthielten, zeigten eine sehr ähnliche räumliche Verteilung. In den infragranulären Schichten verteilten sich die Neurone über die komplette Ausdehnung des Areals mit einer leichten Verdichtung der Zellen in einem Bereich der a-p-Ausdehnung, der sich in der Verteilung der Neurone in den oberen Schichten II bis IV wiederfindet. Dort erstreckten sich die Neurone nur in diesem begrenzten Abschnitt des Areals. In der Projektion aller Neuronenpopulationen ließ sich diese räumliche Anordnung ebenfalls erkennen, wobei die konzentrierte Ansammlung der Zellen über alle beteiligten Schichten mit einer Breite in a-p-Richtung von ~1,4 mm ausgeprägt war.



**Abbildung 4.9:** Räumliche Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS von Katze 5 nach kortikalen Schichten aufgeteilt. Im oberen Bild sind alle Neurone dargestellt, die die Tracer Fluorescein und Tetramethylrhodamin enthalten (F+&R+), im zweiten Bild alle Fluorescein-positiven Neurone (F+), im dritten Bild alle Tetramethylrhodamin-positiven

Neurone (R+). Das untere Bild stellt den Overlay von allen drei vorher gezeigten Neuronenpopulationen dar. Der Maßstab beträgt 1 mm in a-p-Richtung, in l-m-Richtung wurden die Abstände der Schichten so zueinander vergrößert, dass keine Überlappung der Schichten vorkam (a: anterior, m: medial, l: lateral, p: posterior).

#### 4.1.2 RETROGRAD MARKIERTE NEURONE IM CORPUS GENICULATUM LATERALE

Die Zuordnung der Repräsentation des visuellen Feldes wurde über die Verteilung der Neurone in den unterschiedlichen Schichten und Positionen im Corpus geniculatum laterale bestimmt. Hierbei wurden insgesamt 6719 Neurone markiert und der entsprechenden Struktur zugeordnet (Abb. 4.10). Es kam in der Verteilung der Neurone im anterioren Bereich des CGL zu einer Konzentration der markierten Neurone im Bereich von  $0^\circ$  bis  $20^\circ$  in der Ausdehnung der Isoelevation und des Isoazimuths (Sanderson, 1971a, b).

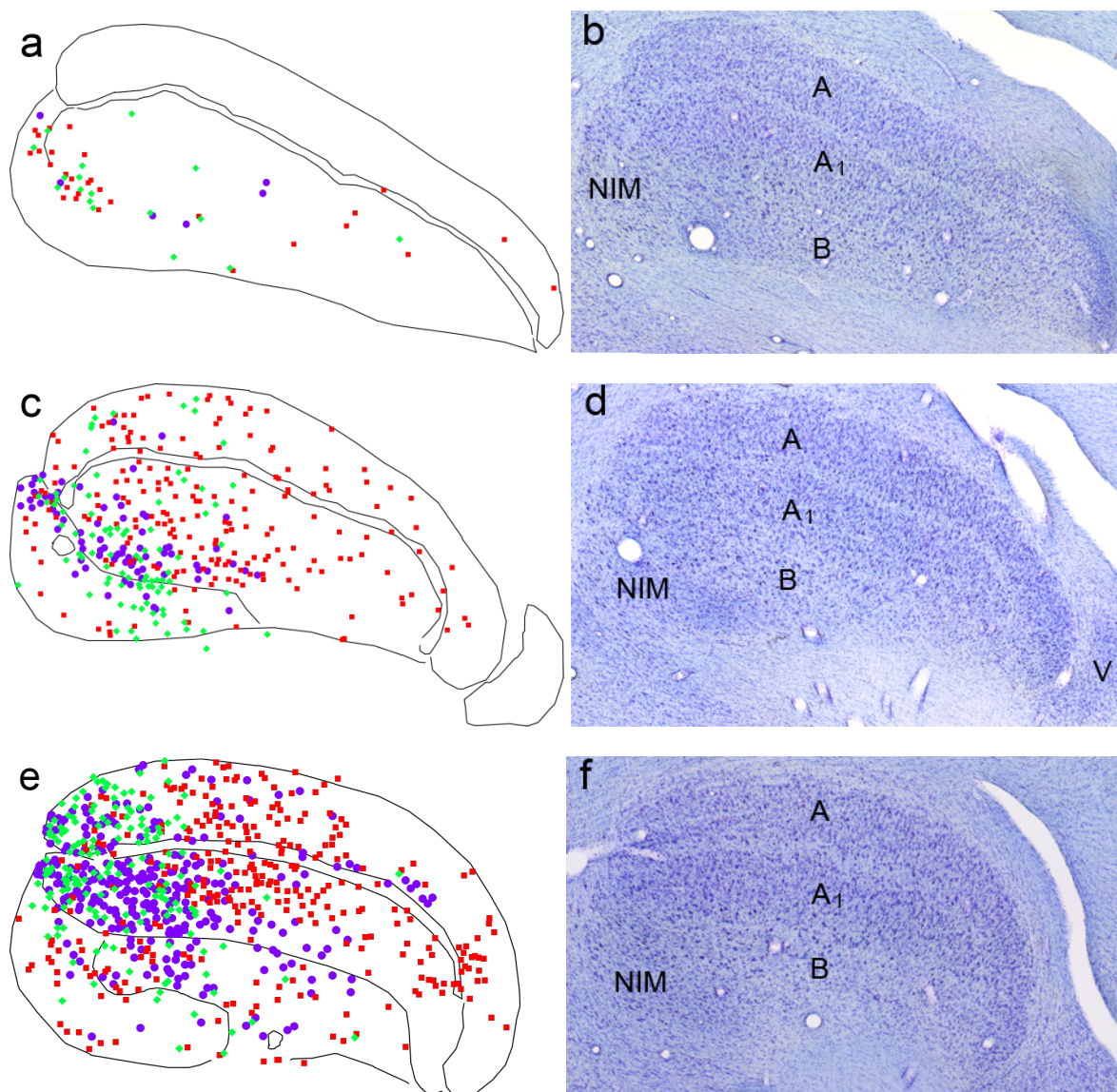
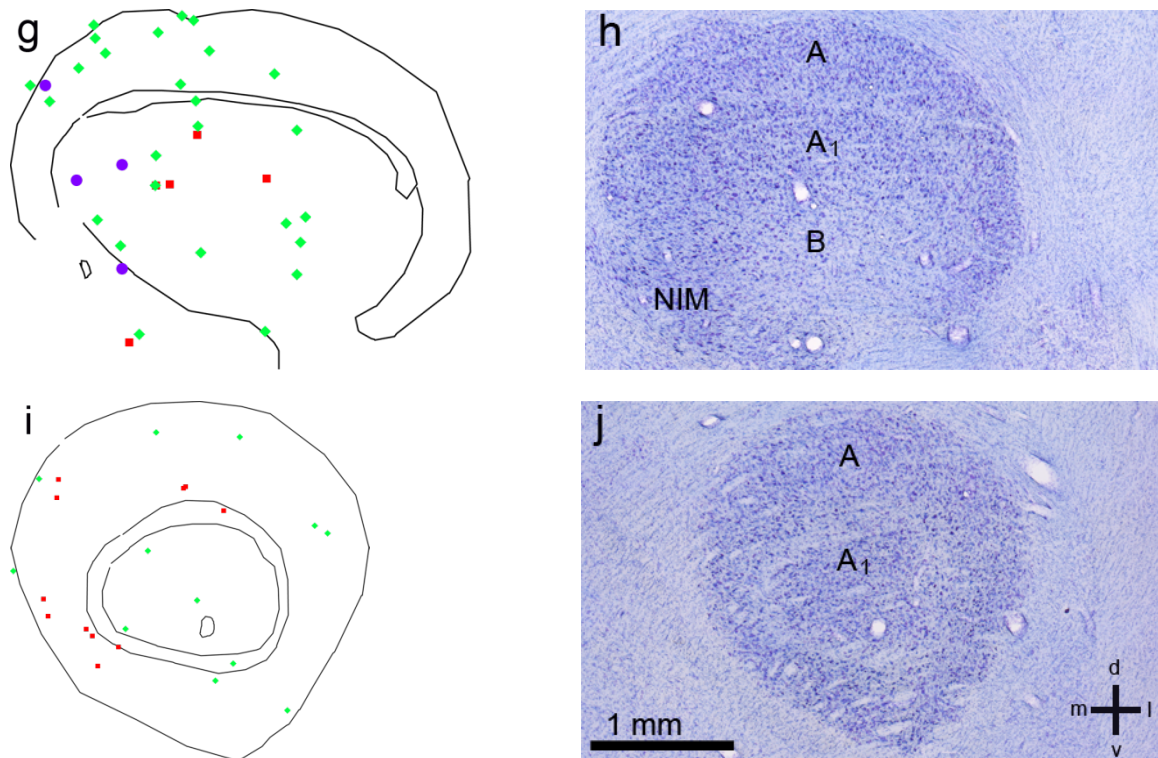


Abbildung 4.10





**Abbildung 4.10:** Verteilung von retrograd markierten Zellkörpern im Corpus geniculatum laterale nach Tracerinjektion in Area 18 (a, c, e, g, i). Die grünen Marker entsprechen den Zellkörpern, die den Farbstoff Dextran konjugiert mit Fluorescein enthalten und die roten Marker den Zellkörpern, die den Farbstoff Dextran konjugiert mit Tetramethylrhodamin enthalten. Die lila Marker geben die Position der Zellkörper an, die beide Farbstoffe enthalten. Die Mikrophotographien auf der rechten Seite (b, d, f, h, j) zeigen die korrespondierenden Nissl-gefärbten Koronarschnitte. Der Maßstab gilt für alle Nissl-Bilder und beträgt 1 mm (A= Pars dorsalis A, A<sub>1</sub>= Pars dorsalis A<sub>1</sub>, B= Pars dorsalis B, NIM= Nucleus interlaminaris medialis, V=Pars ventralis, m: medial, l: lateral, d: dorsal, v: ventral).

## 4.2 INJEKTIONEN IN PMLS

Ziel der Druckinjektionen von biotinylierten Dextranaminen in den PMLS und der Aufnahme der funktionellen Karten im primären visuellen Kortex war es, die genaue anatomische und funktionelle Struktur von Feedback-Projektionen in den primären visuellen Kortex zu untersuchen. Dazu wurden dreidimensionale Rekonstruktionen von Neuronen in PMLS mit ihren kompletten Terminationsfeldern in Area 17 und Area 18 angefertigt und über die aufgenommen kolumnären Muster im primären visuellen Kortex mit den funktionellen Eigenschaften der dortigen Neuronen zur Deckung gebracht.

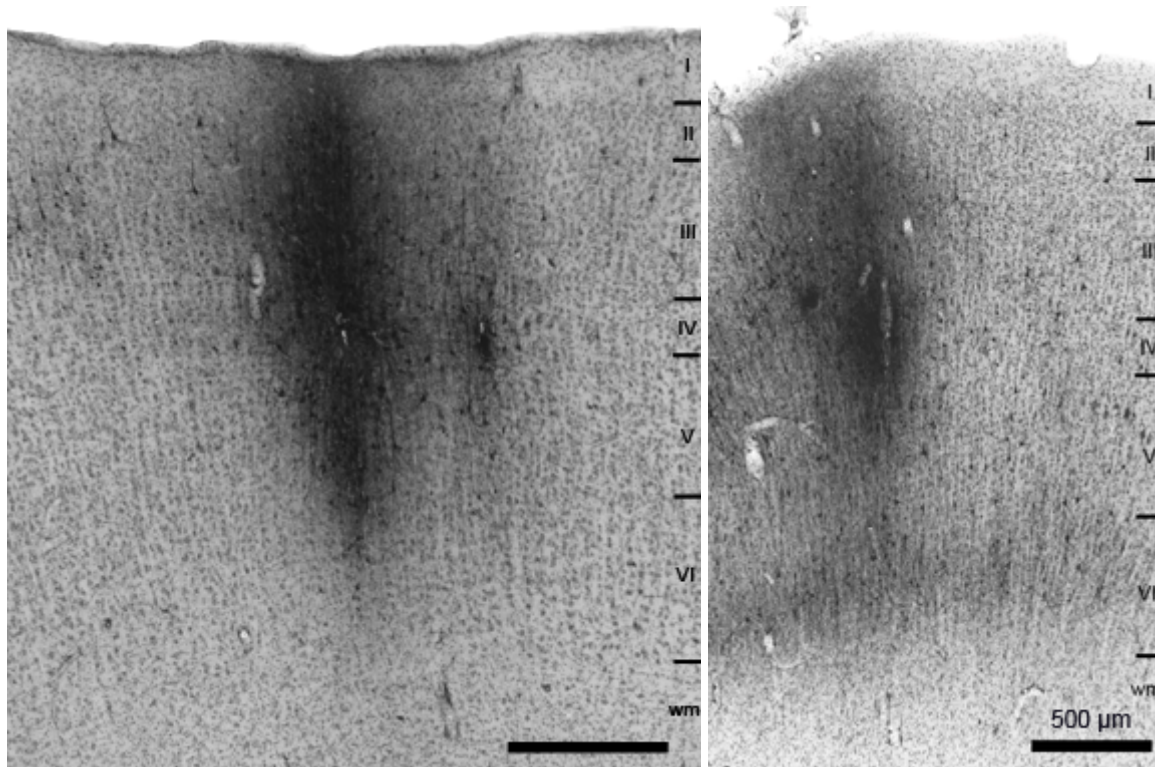
Es wurden insgesamt fünf komplette Axone mit ihren Terminationsfeldern rekonstruiert (2 Axone von Katze 1 und 3 Axone von Katze 4) und für 3 dieser Axone konnten die funktionellen Eigenschaften bestimmt werden. Bevor diese Ergebnisse dargestellt werden, werden die Injektionsstellen genauer betrachtet und die globalen Projektionsmuster beschrieben.

#### 4.2.1 INJEKTIONSSTELLEN IN PMLS

Die Injektionsstellen waren nach der Entwicklung der BDA-Färbung in beiden Katzen sehr gut sichtbar (Abb. 4.11). Die Injektionsstellen beschränkten sich in beiden Fällen nur auf Bereiche innerhalb der grauen Substanz und eine unkontrollierte Verteilung des Tracers durch die Kontamination von an der Injektionsstelle vorbeiziehenden Fasern konnte ausgeschlossen werden.

Die Injektionsstelle bei Katze 1 hatte eine Ausdehnung von 510  $\mu\text{m}$  in Anterior-Posterior-Richtung. Bei Katze 4 lag die Ausdehnung der Injektionsstellen in Anterior-Posterior-Richtung bei bis zu 650  $\mu\text{m}$ .

Durch die erfolgreiche Druckinjektion waren beide Schnittserien für die weitere Analyse der Färbung, der globalen Projektionen und für die Rekonstruktion von Axonen, verwendbar.



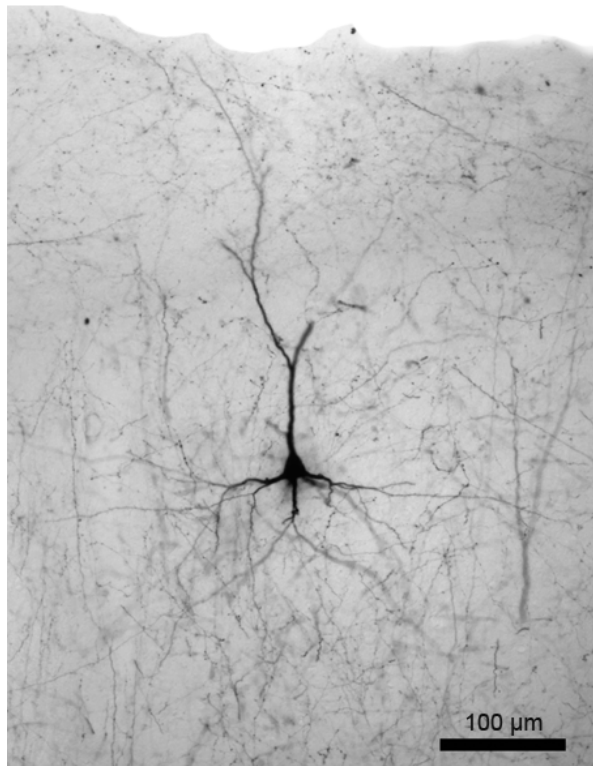
**Abbildung 4.11:** Injektionsstellen in PMLS von Katze 1 (rechtes Bild) und Katze 4 (linkes Bild). Im Bereich der Injektionsstelle befinden sich in beiden Bildern gefärbte Zellen und Rückstände des Tracers, der sich im Gewebe verteilt hat. Durch die Druckinjektion wurde die weiße Substanz nicht verletzt. Die Grenzen der Kortexschichten wurden über eine Gegenfärbung mit Nissl sichtbar gemacht und sind mit schwarzen Balken angedeutet sowie mit römischen Zahlen (I bis VI) gekennzeichnet. Die Grenze zur weißen Substanz (wm) ist ebenfalls mit einem Balken markiert. Der Maßstab beträgt in beiden Bildern je 500  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 ANTEROGRADE UND RETROGRADE MARKIERUNG VON NEURONEN

Der in dieser Studie gewählte intrazelluläre Tracer hat die Erwartungen der Visualisierungen von sehr feinen strukturellen Merkmalen von Neuronen erfüllt. Per Diffusion in retrograder Richtung konnten Neurone in ihrer kompletten Ausdehnung des Zellkörpers

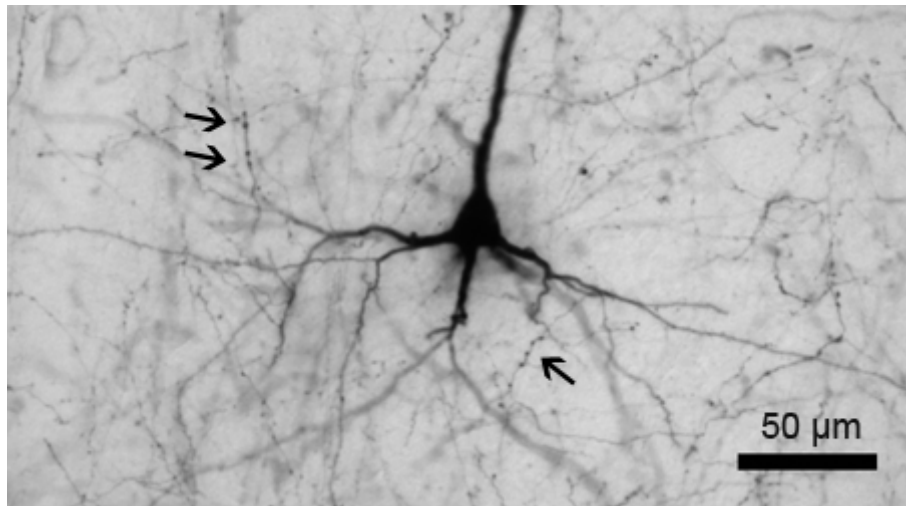


und der Dendritenfelder markiert werden (Abb. 4.12) und waren somit für die Untersuchung der von PMLS ausgehenden Projektionen geeignet.

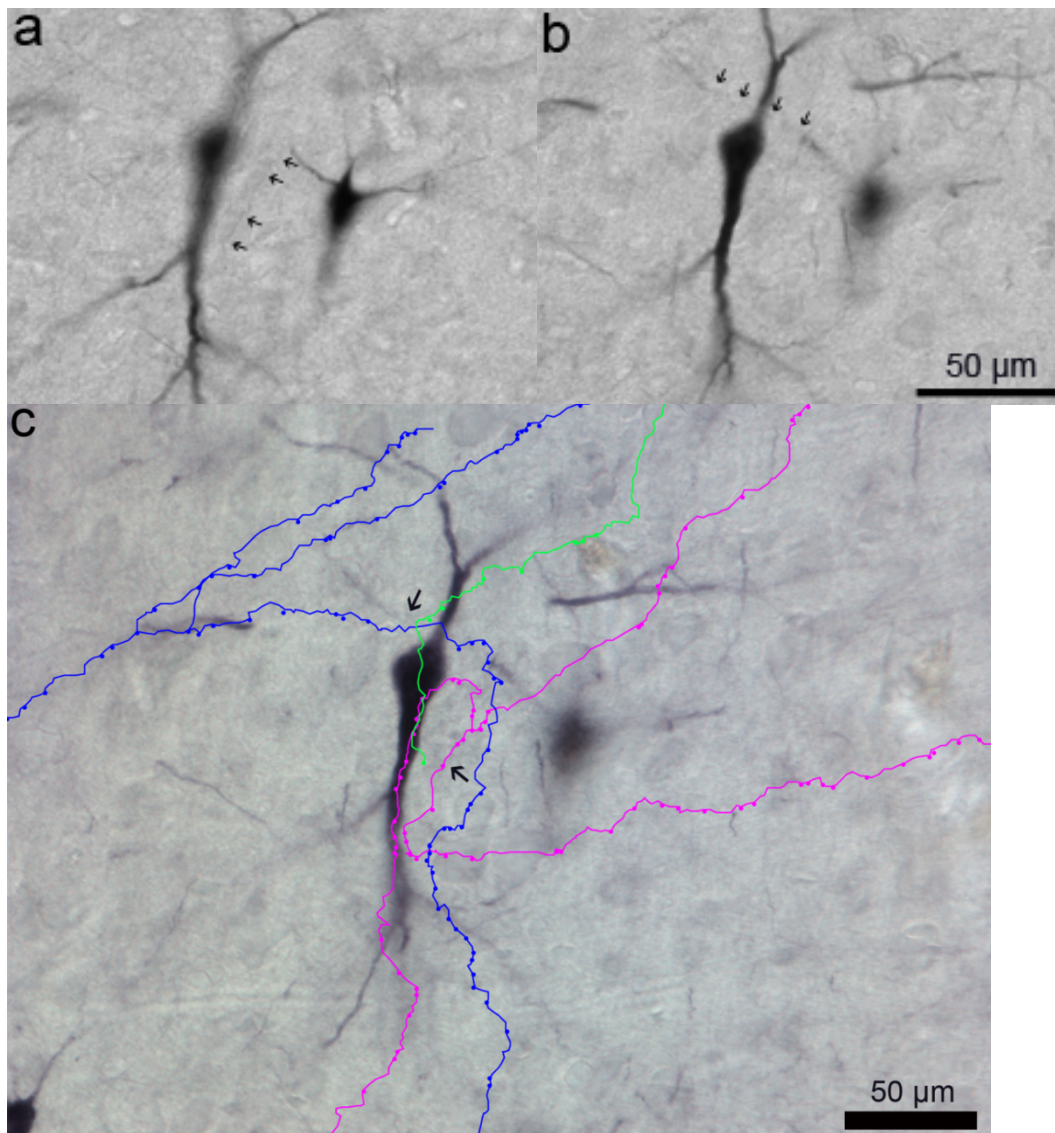


**Abbildung 4.12:** Retrograd markierte Pyramidenzelle mit Apikal- und Basaldendriten in Area 18. Der aufsteigende Apikaldendrit zieht bis in Schicht I hinein. Die Dendriten erscheinen stellenweise unvollständig, da sie auf den Nachbarschnitten fortlaufen. Um die Pyramidenzelle sind anterograd markierte Fasern erkennbar. Der Maßstabsbalken ist 100 µm lang.

Die Diffusion in anterograder Richtung machte sehr feine Strukturen von Terminalien und anderen synaptischen Verknüpfungen (Boutons) vorwiegend im Umfeld von retrograd markierten Neuronen sichtbar (Abb. 4.13), es wurden aber ebenfalls Strukturen gefunden, die direkt auf retrograd markierten Zellkörpern zu liegen kamen (Abb. 4.14). Diese Terminationsstrukturen wurden im Folgenden für die Rekonstruktion von Feedback-Projektionen von PMLS herangezogen.



**Abbildung 4.13:** Detailansicht einer BDA markierten Pyramidenzelle in Area 18. Die Zelle ist umgeben von einer Vielzahl anterograd markierten Fasern. Diese Fasern bilden an unterschiedlichen Stellen punktförmige synaptische Verknüpfungen (Boutons, Pfeile) aus. Der Maßstab beträgt 50 µm.



**Abbildung 4.14**

**Abbildung 4.14:** Detailaufnahme von anterograd markierten Terminationsstrukturen in Schicht III (a und b) und Overlay mit Teilen des Terminationsfeldes T2 von Axon 1 in Area 18 (c). Die Pfeile in a und b markieren jeweils einen sichtbaren Teil der Terminationsstruktur, welche in c nachgezeichnet wurden. Der Maßstab in b gilt ebenfalls für a und beträgt, wie auch in c, 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3 ORGANISATION RETROGRAD MARKIERTER NEURONE

Neben der anterograden Färbung von Axonen zeigten sich nach der Injektion in PMLS auch retrograd markierte Zellkörper in zahlreichen visuellen Arealen sowie auch lokal in PMLS. Darum lässt sich schließen, dass viele Areale reziprok mit PMLS verbunden sind. Die Verteilung der retrograd markierten Zellkörper war diskontinuierlich und es konnten einzelne Zellansammlungen oder Patche abgegrenzt werden. Diese Ansammlungen unterschieden sich in der Ausdehnung der Zellen über die kortikalen Schichten. Es waren Zellansammlungen vorhanden, die sich auf einzelne oder nur 2 bis 3 Schichten beschränkten (Abb. 4.15) oder über alle Schichten verteilten (Abb. 4.16). Die Lage und die Ausdehnung dieser Patches in den einzelnen Arealen wurden in Rahmen einer Diplomarbeit bei Katze 1 untersucht (Frey, 2006). Dabei wurden Patches in den Arealen 18, 19 und PMLS vermessen. Es ergab sich eine durchschnittliche Patchgröße für alle Areale von  $\sim 450 \mu\text{m}$  im Durchmesser. In Area 17 wurden keine Patchstrukturen gefunden. Die ermittelten Daten ließen sich ebenfalls bei Katze 4 bestätigen.



**Abbildung 4.15:** Anordnung der Zellkörper in Area 18. Die Patche sind mit Pfeilen angedeutet. Der Maßstab beträgt 100  $\mu\text{m}$ .



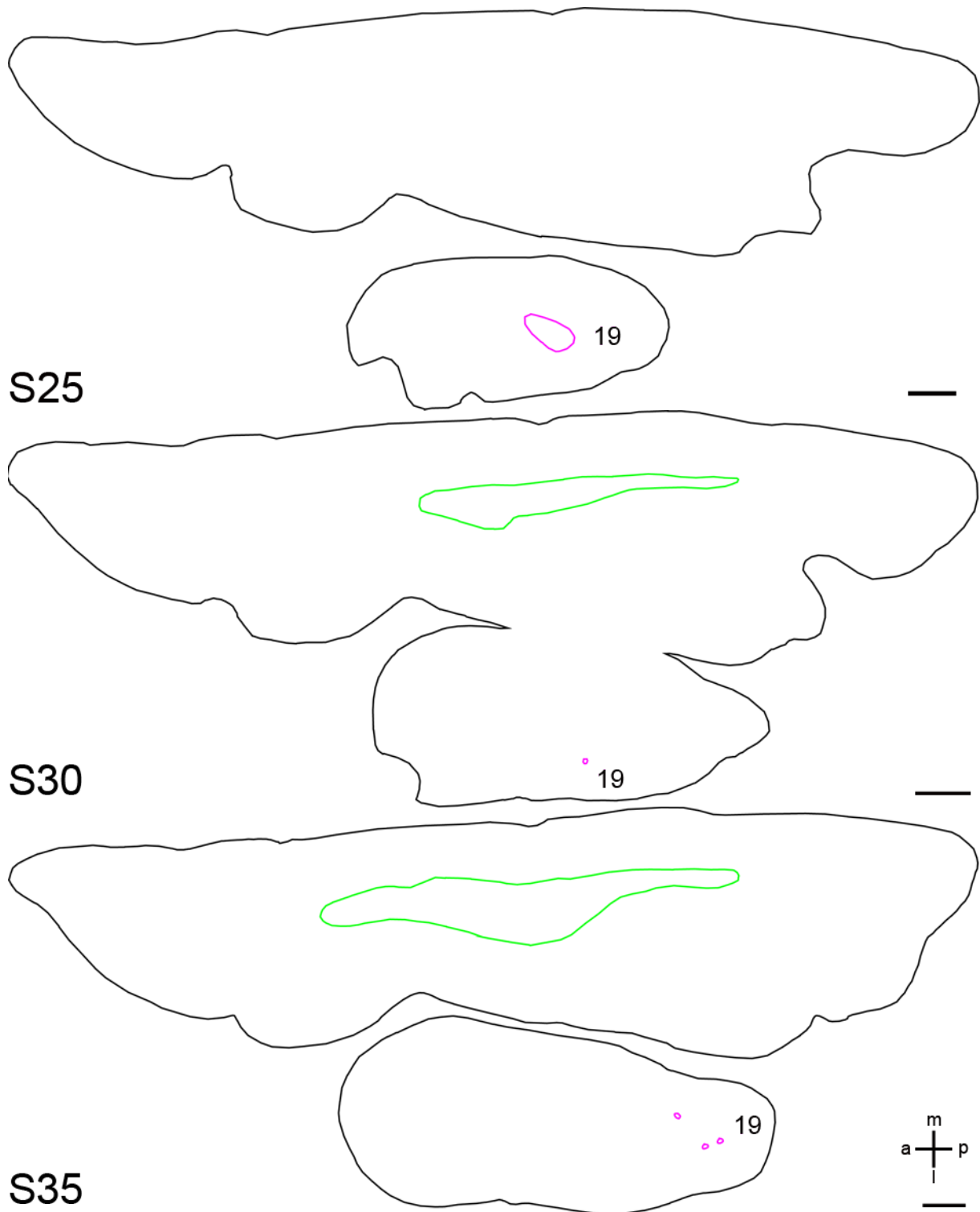
**Abbildung 4.16:** Anordnung der Zellen über alle Schichten (graue Pfeile) und in Patches (schwarze Pfeile) in PMLS. Der Maßstab rechts unten ist 200 µm lang.

#### 4.2.4 GLOBALE PROJEKTIONSMUSTER

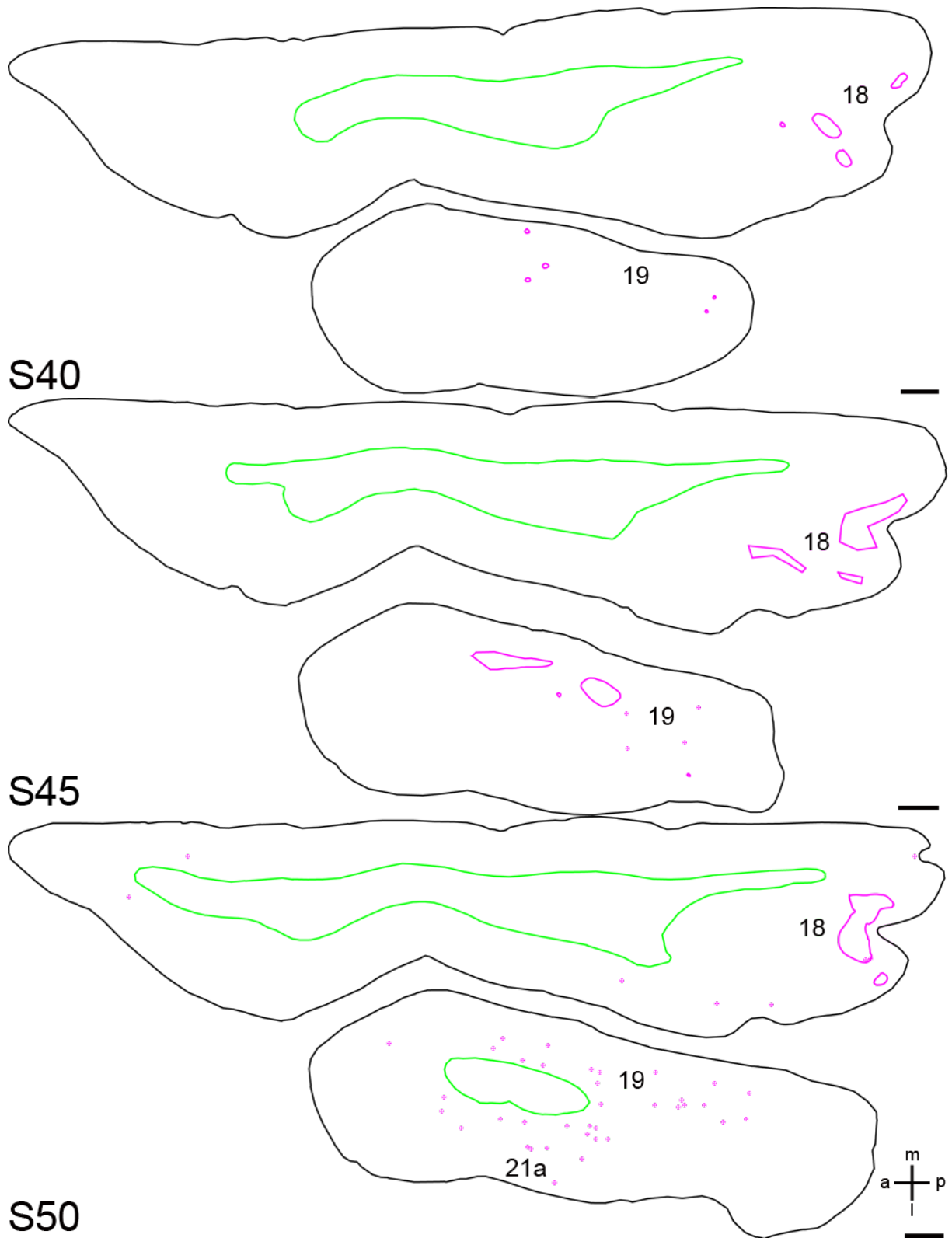
Für die Beschreibung aller Projektionsgebiete von PMLS wurden Übersichtszeichnungen angefertigt und die Position der Patches und der Injektionsstelle markiert. Nach Abschluss aller Rekonstruktionen wurden die Schnittserien mit Kresylviolett gefärbt und die Areale bestimmt.

Es wurden Projektionen in die primären visuellen Areale 17 und 18 im Gyrus lateralis gefunden, in Area 19 im Sulcus lateralis und im Gyrus suprasylvius zu Area 21a und Area 7. Auf dem suprasylvischen Sulcus wurden neben lateralen Projektionen in PMLS ebenfalls Projektionen nach AMLS, ALLS und PLLS gefunden (Abb. 4.17 bis 4.23).

Für alle folgenden Übersichtszeichnungen gelten die gleichen Beschreibungen: die schwarzen Linien entsprechen den äußeren Konturen, die grünen Linien kennzeichnen die Grenzen zu weißen Substanz, mit pinken Marker sind einzelne Zellen markiert und mit pinken Konturen sind Zellansammlungen gekennzeichnet. Die Injektionsstelle ist mit einer lila Kontur umrandet und mit einem Stern (\*) markiert. Die Zahlen in der Zeichnung geben das entsprechende Areal an. Der Maßstabsbalken entspricht immer 1 mm und die Orientierung aller Zeichnungen ist identisch.

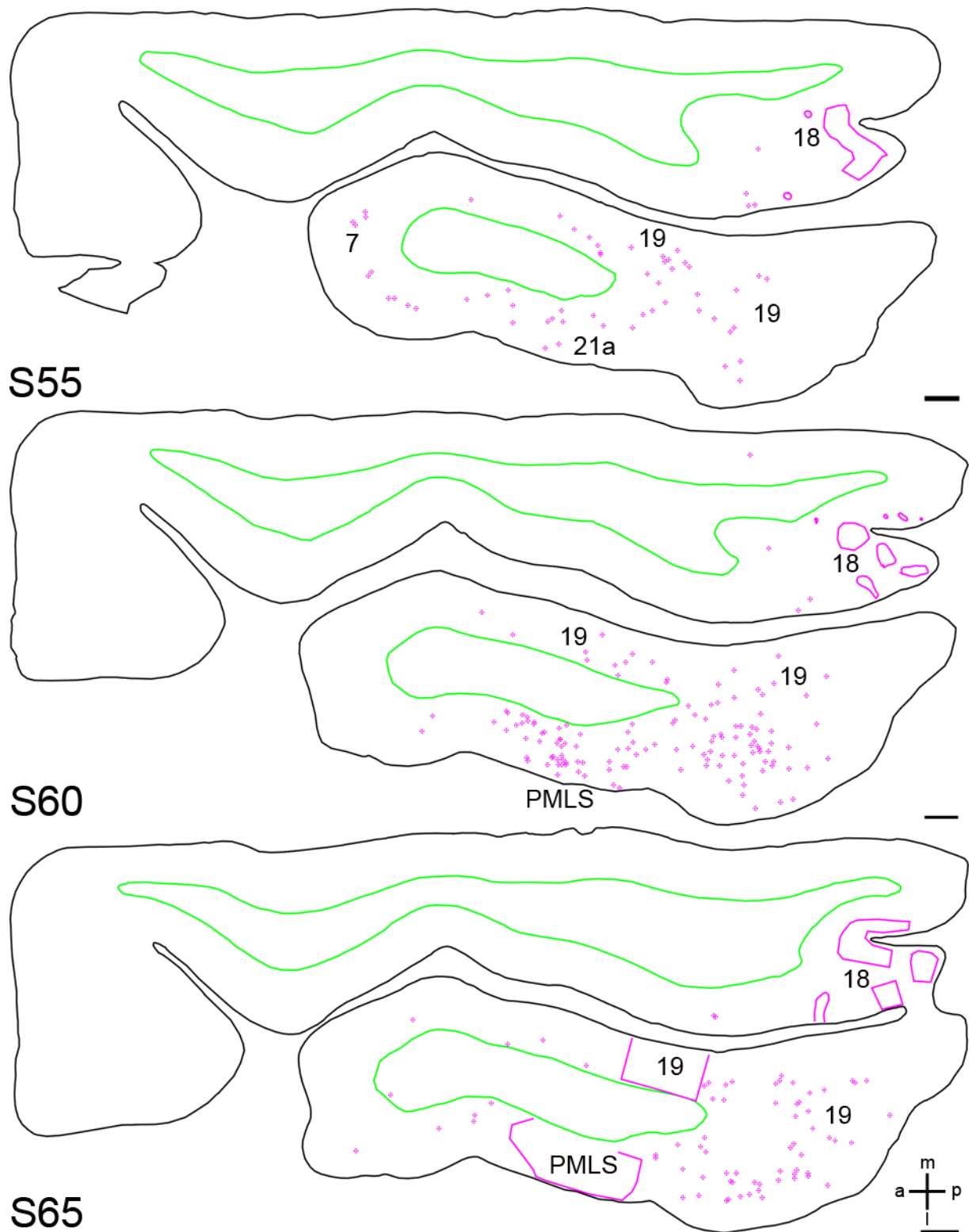


**Abbildung 4.17:** Übersichtszeichnungen der Schnitte 25, 30 und 35. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral, Erklärung Seite 65).

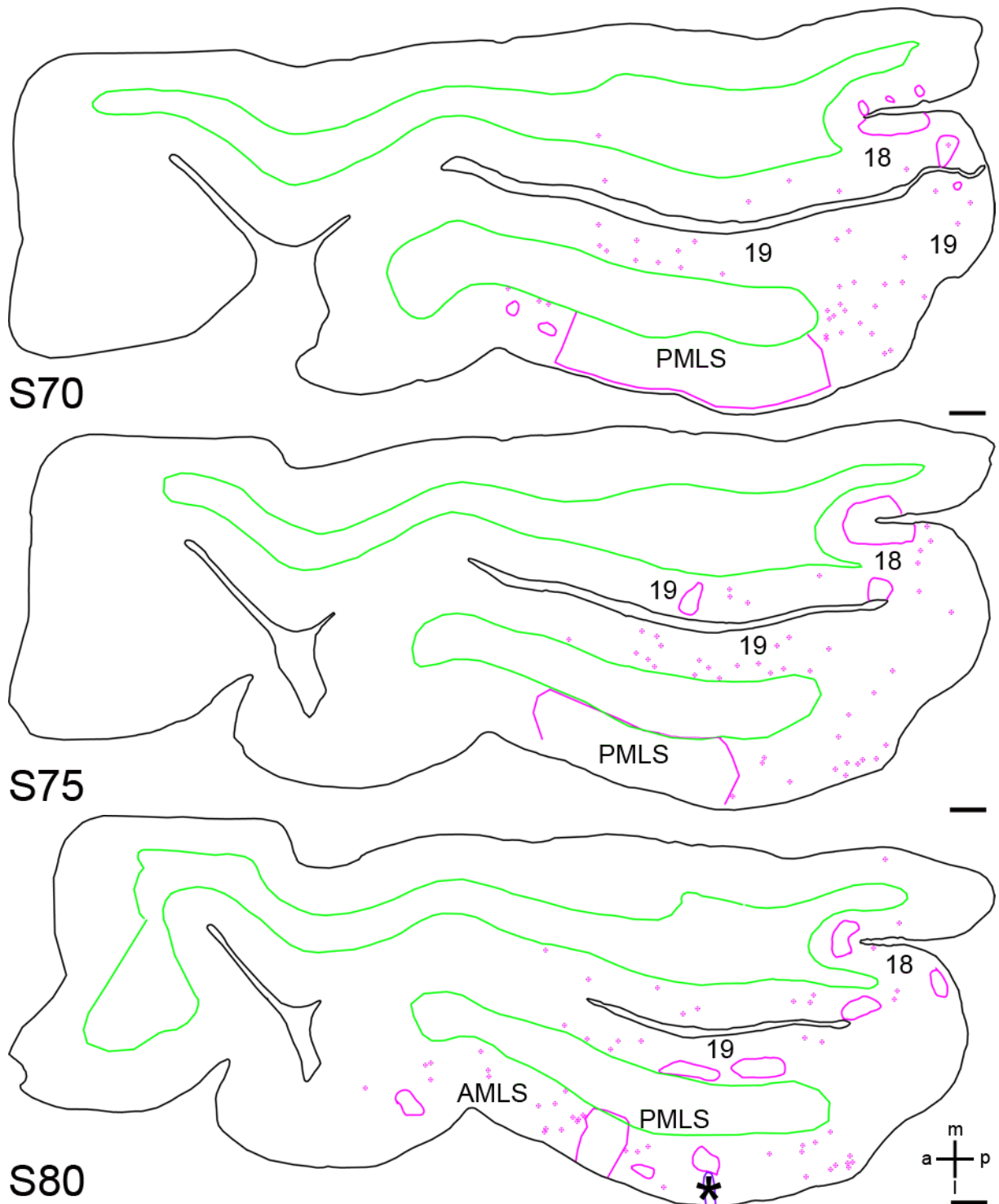


**Abbildung 4.18:** Übersichtszeichnungen der Schnitte 40, 45 und 50. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral, Erklärung Seite 65).



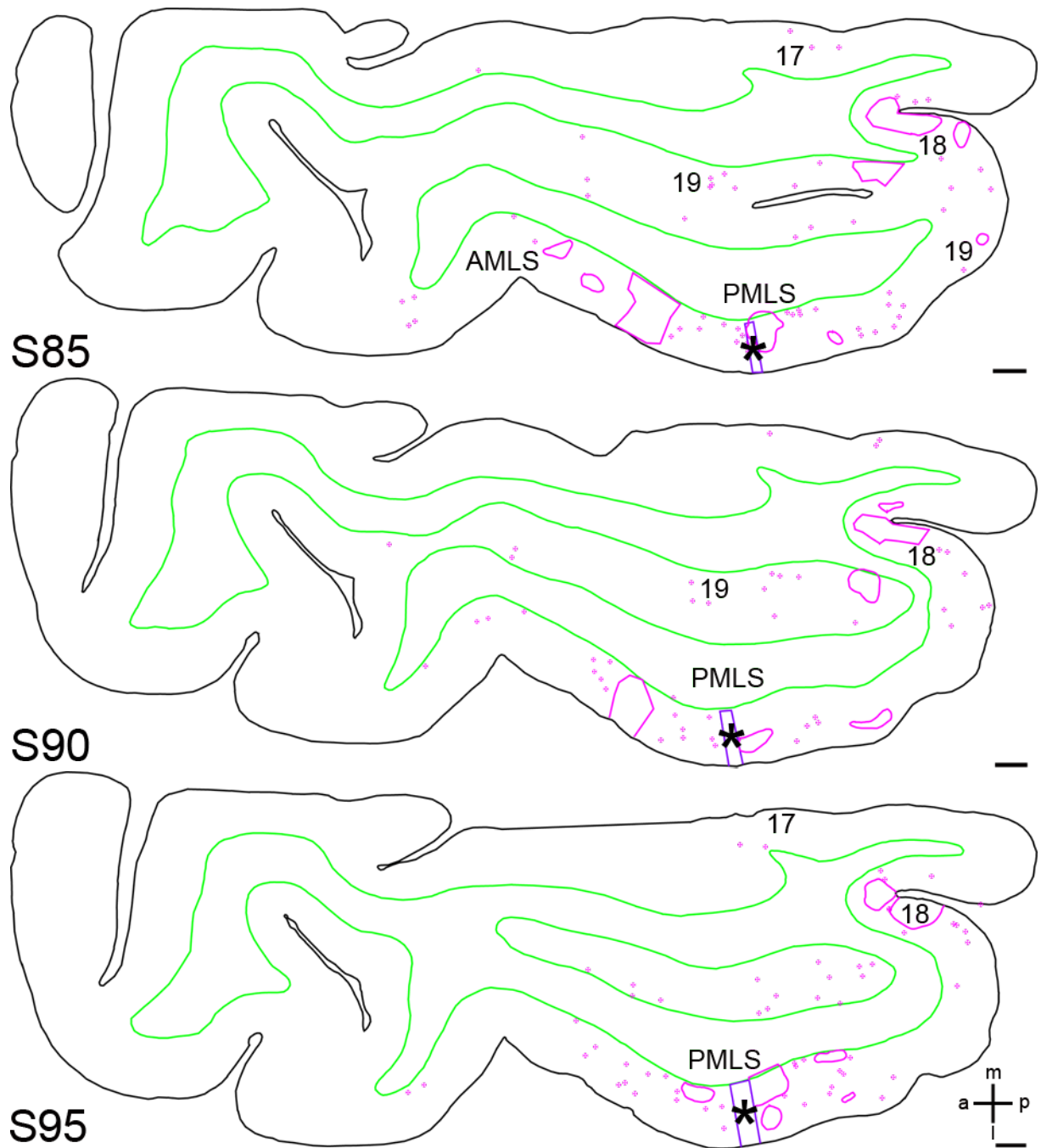


**Abbildung 4.19:** Übersichtszeichnungen der Schnitte 55, 60 und 65. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral, Erklärung Seite 65).

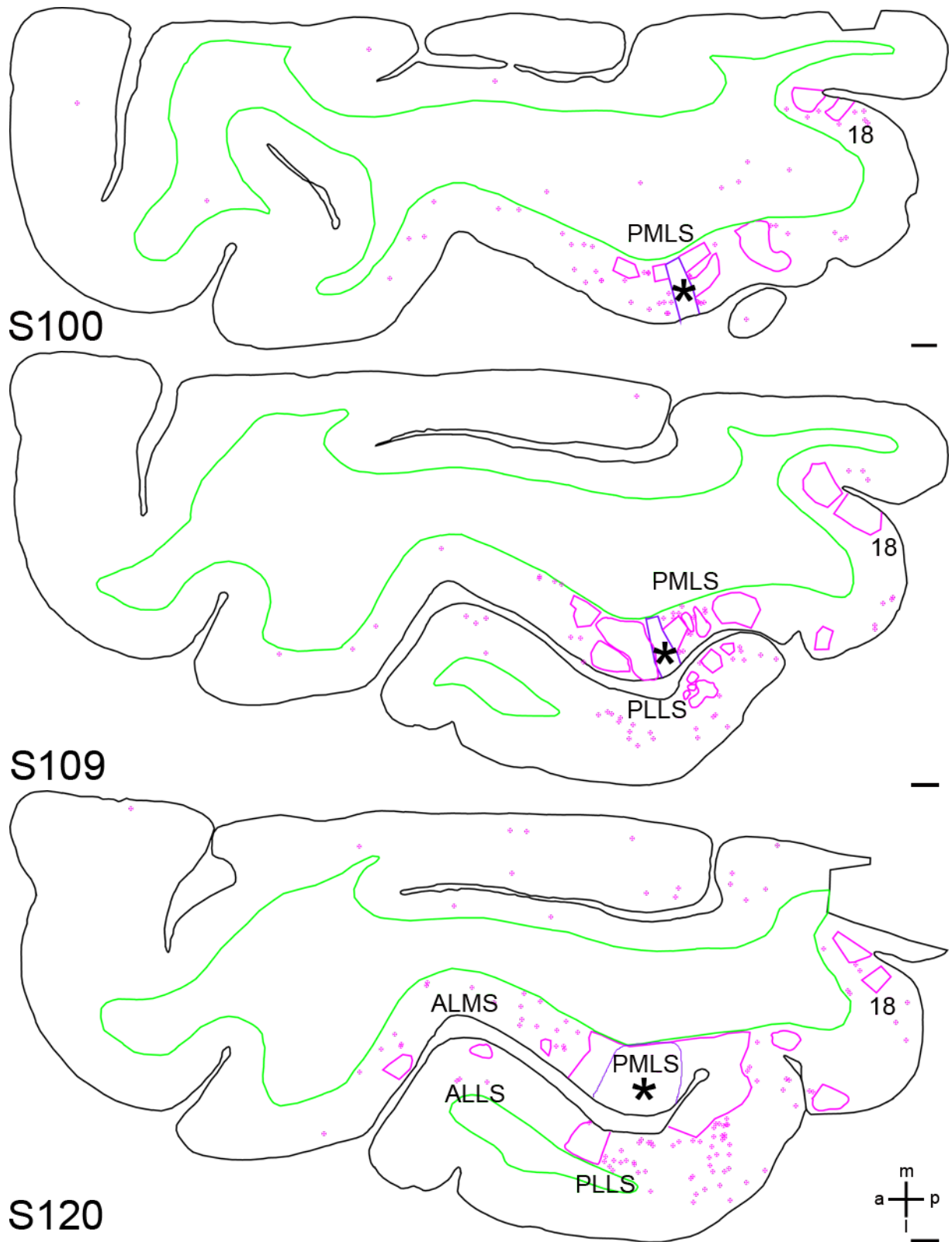


**Abbildung 4.20:** Übersichtszeichnungen der Schnitte 70, 75 und 80. Die Injektionsstelle ist hier das erste Mal in PMLS (lila Kontur und \*) sichtbar. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral, Erklärung Seite 65).

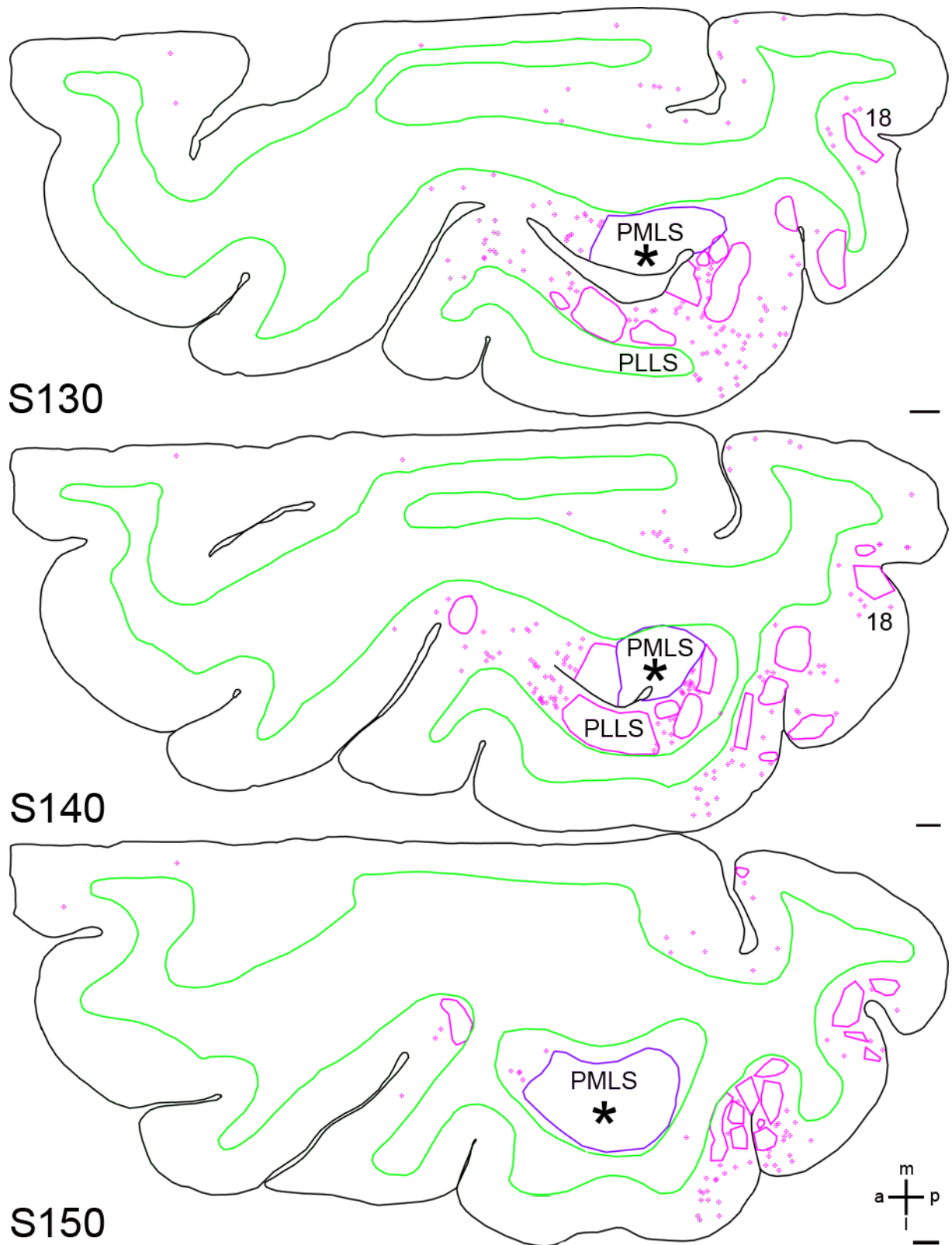




**Abbildung 4.21:** Übersichtszeichnungen der Schnitte 85, 90 und 95. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral, Erklärung Seite 65).



**Abbildung 4.22:** Übersichtszeichnungen der Schnitte 100, 109 und 120. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral, Erklärung Seite 65).



**Abbildung 4.23:** Übersichtszeichnungen der Schnitte 130, 140 und 150. Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm (a: anterior, p: posterior, m: medial, l: lateral, Erklärung Seite 65).

#### 4.2.5 FEEDBACK-PROJEKTIONEN VON PMLS IN DEN PRIMÄREN VISUELLEN KORTEX

Für fünf Axone wurden dreidimensionale Rekonstruktionen von der Injektionsstelle in PMLS in den primären visuellen Kortex mit Neurolucida angefertigt.

Die Axone unterschieden sich in ihrer Morphometrie, wobei die Gesamtlänge, die Anzahl an Verzweigungen, die Häufigkeit und die Dichte der synaptischen Verknüpfungen, sowie die räumliche Anordnung der Terminationsmuster für die Beschreibungen herangezogen wurden.

Es kamen neben komplexen Anordnungen der Terminationsfelder auch sehr einfache Strukturen vor. Als Beispiel für eine einfache Morphologie dient Axon 3. Es hatte eine Gesamtlänge von 14,6 mm und nur 3 Verzweigungsebenen in einem Terminationsfeld. Die Gesamtdichte der Boutons betrug 19 Boutons pro mm. Im Gegensatz dazu wies Axon 1 eine sehr komplexe Struktur auf. Es hatte eine Gesamtlänge von 76,8 mm mit 96 Verzweigungspunkten auf insgesamt 20 Verzweigungsebenen. 4878 Boutons verteilten sich mit einer Gesamtdichte von 63 Boutons pro mm auf 4 räumlich voneinander getrennte Terminationsgebiete.

Neben der Morphometrie der Axone waren die Zielregionen der einzelnen Terminationsfelder und die Schichtzugehörigkeit der Boutons wichtige Kriterien für die Unterscheidung der Axone. Das Axon 5 sendete seine Projektionen nur nach Area 18 aus. Die Axone 2 und 4 wiesen neben Terminationen in Area 18 auch welche in Area 17 auf. Die Boutons kamen in unterschiedlichen Schichtkombinationen zu liegen. Bei dem sehr einfachen Axon 3 befanden sich die Boutons nur in den Schichten V und VI, wohingegen das Axon 1 Boutons in den Schichten II bis VI ausbildete.

Im Folgenden soll nun jedes Axon im Detail genau betrachtet werden. Für die Darstellungen der Axone wurden in allen Bildern die gleichen Konventionen gewählt. Jedes Bild setzt sich aus der Zeichnung eines Axons oder eines Terminationsfeldes in der Aufsicht und den dazugehörigen Konturen der Horizontalschnitte zusammen. Die Schnittkonturen geben die Position innerhalb der Schnittserie an. Die Schnittnummer wird durch die große Zahl neben der Schnittkontur angegeben, wobei der oberste Schnitt einer Serie die Nummer 1 trägt. In den Konturen ist die Position des Axons oder des Terminationsfeldes mit einem x gekennzeichnet. Um diese Position ebenfalls an den Zeichnungen sichtbar zu machen, wurde die Schnittnummer an den entsprechenden Abschnitt des Axon gesetzt. Die Axone verlaufen stellenweise innerhalb der weißen Substanz. Um diese Übergänge zu markieren, wurden kurze Balken an den Übergängen eingefügt. Die Beschriftung (wm: weiße Substanz) befindet sich immer auf der Seite der weißen Substanz. Die Abzweigungen der Terminationsfelder (T) sind mit Sternen (\*) markiert, die sich in den Detailansichten der

Terminationsfelder an der gleichen Position befinden. Die Felder wurden im Uhrzeigersinn durchnummeriert. Jedes Terminationsfeld wird nach der Gesamtdarstellung im Detail gezeigt. Dabei sind die synaptischen Verknüpfungspunkte in den Zeichnungen durch Punkte gekennzeichnet und unvollständige Terminationsäste werden mit einem „+“ markiert. Der Maßstabsbalken befindet sich unten rechts und beträgt bei den Komplettansichten jeweils 1 mm und bei den Detailbildern der Terminationsfelder jeweils 100 µm. Die Orientierung der Bilder wird durch das Achsenkreuz festgehalten und ist ebenfalls in jedem Bild identisch. Die horizontale Achse entspricht der Anterior-Posterior-Achse (a-p) und die vertikale Achse der Medial-Lateral-Achse (m-l).

Alle ermittelten morphometrischen Daten befinden sich in tabellarischer Form im Anhang. Für die genaue Bestimmung der Lage der Axone im Gewebe wurde zusätzlich zu den zweidimensionalen Ansichten für alle Axone und ihre Terminationsfelder, Filmsequenzen mit dem Modul „Solid Modeling“ in Neurolucida angefertigt. Eine Übersicht befindet sich in Kapitel 8.7.5 und die Filmsequenzen befinden sich auf der beigefügten CD.

#### **4.2.5.1 Axon 1**

Axon 1 hatte eine Gesamtlänge von 76,8 mm, welche sich auf 20 Verzweigungsebenen verteilte. Insgesamt ließen sich 96 Knotenpunkte und 4878 Boutons bestimmen. Es hatte eine Gesamtausdehnung von 4,5 mm in A-P-Richtung und 7,2 mm in M-L-Richtung. Für die Rekonstruktion wurden 61 aufeinander folgende Horizontalschnitte verwendet, was eine Ausdehnung der Z-Achse in der Zeichnung von 1,5 mm entsprach. Nach Korrektur der Schrumpfung, die für alle Zeichnungen in D-V-Richtung bestimmt werden konnte, entsprach die ursprüngliche Ausdehnung 3,6 mm (die korrigierten D-V-Werte sind in Tabelle 14 in Klammern angegeben).

Das Axon verlief vom Startpunkt aus 7052 µm innerhalb der weißen Substanz, bis es sich das erste Mal verzweigte. Eine Verzweigung zog 1,1 mm weiter in anteriore Richtung bis es zu einer erneuten Teilung kam und sich die Terminationsgebiete T1 bis T3 abzweigten. Die zweite Verzweigung zog in posteriore Richtung und fächerte sich nach 1,8 mm in das Terminationsfeld T4 auf (Abb. 4.24). Alle Terminationsfelder von Axon 1 befanden sich in Area 18.

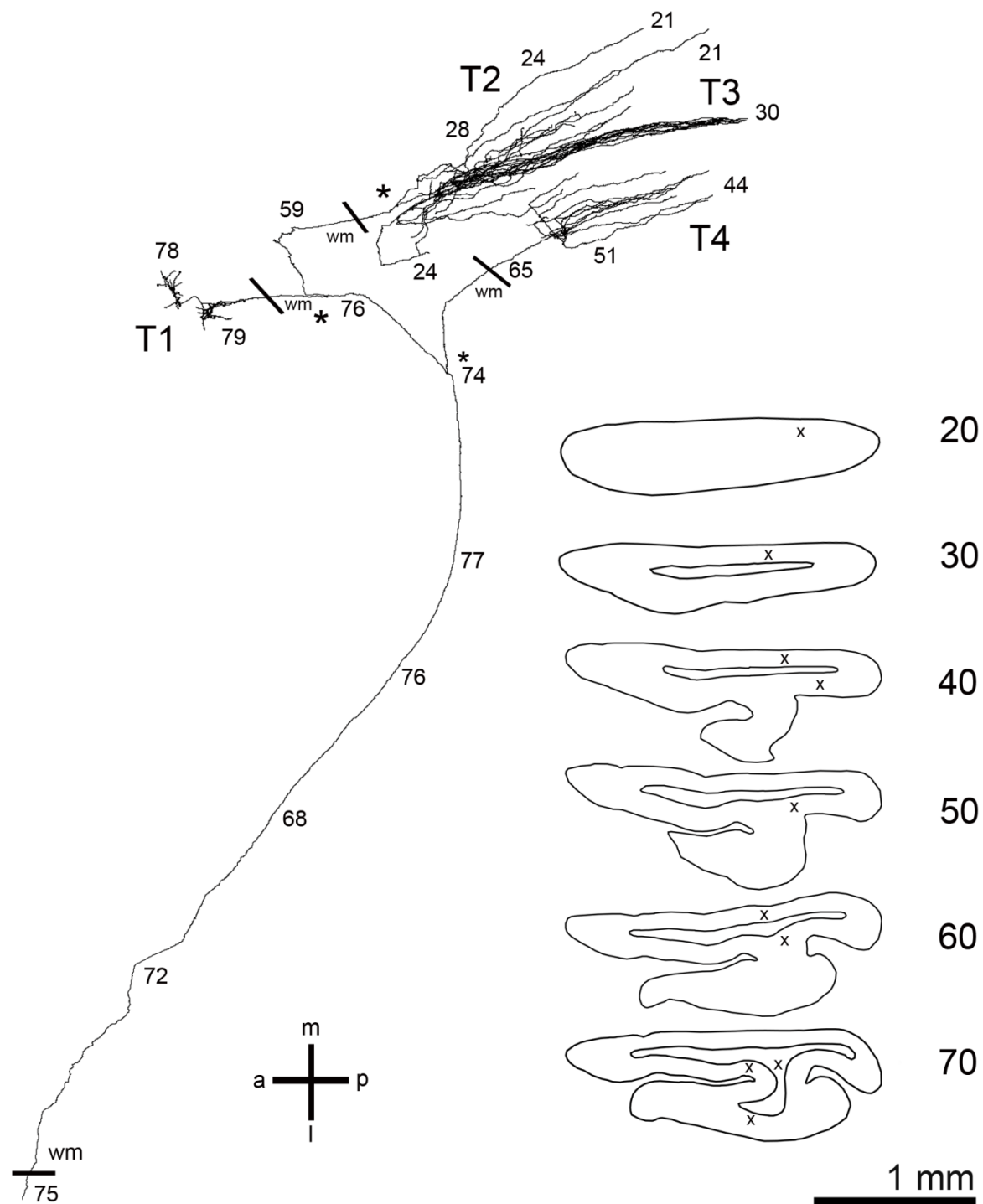
Das Gebiet T1 hatte insgesamt 40 Verzweigungspunkte (Knoten) und die Gesamtlänge aller enthaltenen Axonsegmente betrug 4,8 mm. Nach dem Eintritt in die graue Substanz bildete das Axon mehrere Verzweigungsäste aus, die sich parallel ausbreiteten. Von einem dieser Äste spaltete sich in medialer Richtung ein zweites Feld ab, welches aber aufgrund der Lage in einen Bereich mit sehr hoher Hintergrundfärbung, verursacht durch retrograd markierte Neurone, an 8 Stellen nicht komplett nachgezeichnet werden konnte (Abb. 4.25). Es enthielt 311 Boutons mit einer Dichte von 65 Boutons pro mm. Die Boutons

verteilt sich auf die Schichten III bis VI (III: 2, IV: 177, V:108, VI:24) und das Terminationsgebiet nahm ein Volumen von  $101 \mu\text{m}^3$  ein.

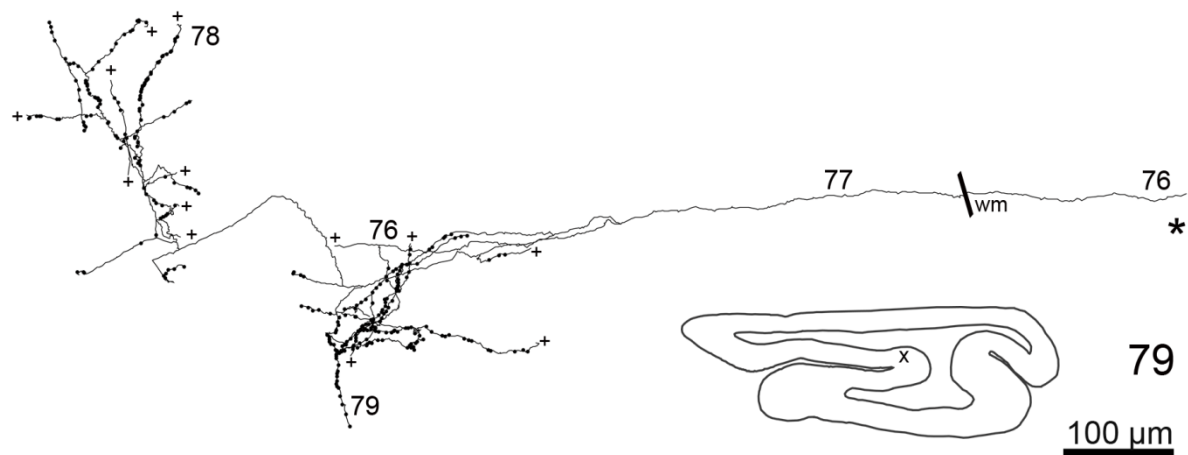
Das Gebiet T2 bildete sich in posterior-medialer Richtung zu T1 aus (Abb. 4.26). Nach dem Eintritt in die graue Substanz, verzweigte sich das Axon in posterior-lateraler Richtung und nahm mit 27 Knoten eine Gesamtlänge von 24,7 mm auf ein Volumen von  $664 \mu\text{m}^3$  ein. Es wurden mehrere parallel verlaufende Äste ausgebildet, die insgesamt 1714 Boutons mit einer Dichte von 69 Boutons pro mm trugen. Die Boutons befanden sich in den Schichten II bis VI (II: 34, III: 742, IV: 235, V: 457, VI: 246).

Das Gebiet T3 spaltete sich vom gleichen Verzweigungsast wie T2 ab, verlief aber ventral dazu. Es wurden 12 Knoten ausgebildet und die dadurch entstandenen Äste verliefen vorwiegend parallel zueinander in posteriorer Richtung (Abb. 4.27). Das komplette Gebiet nahm ein Volumen von  $700 \mu\text{m}^3$  ein mit einer Gesamtlänge von 23,9 mm. Insgesamt wurden 2216 Boutons mit einer Dichte von 93 Boutons pro mm gezählt. Die Boutons befanden sich nur in Schicht IV (n= 65) und in Schicht V (n=2151).

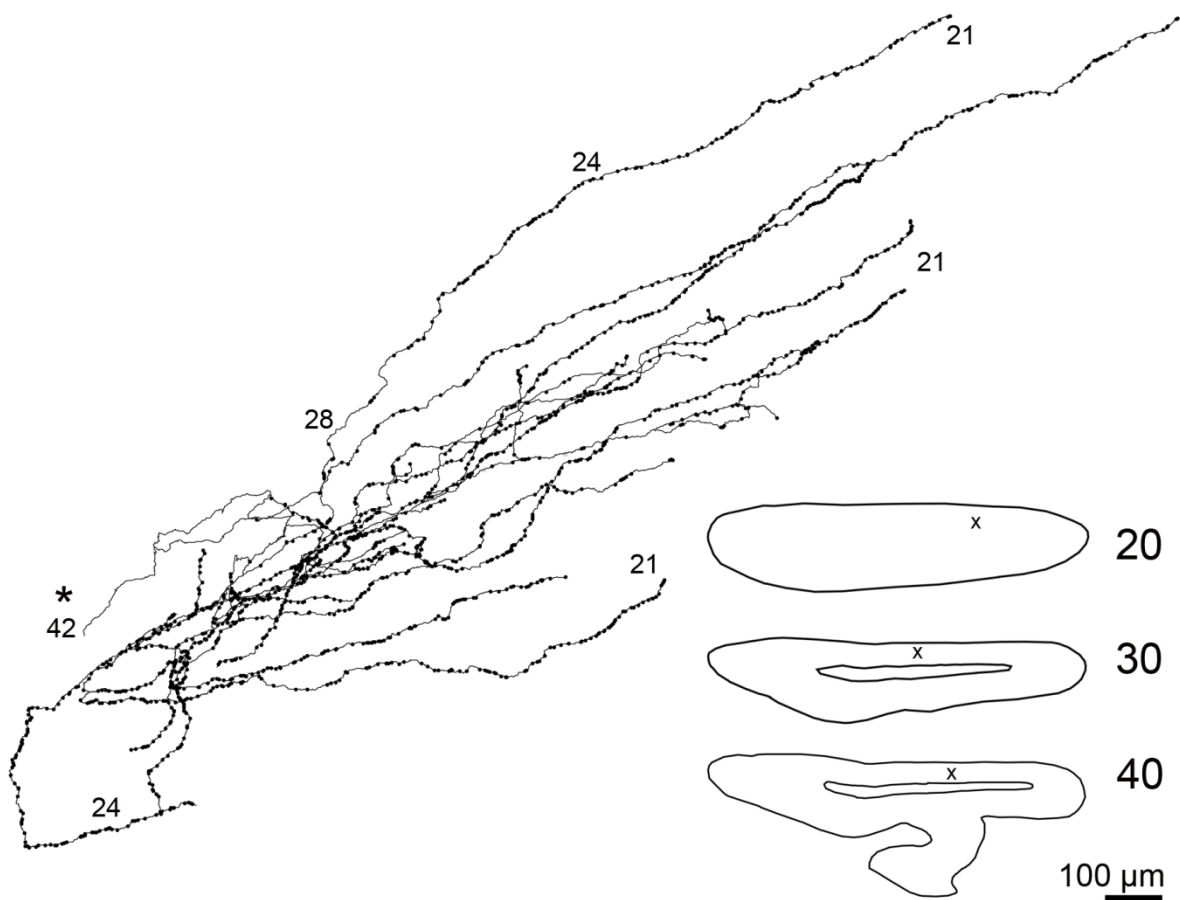
Das Gebiet T4 entstand aus der ersten Verzweigung des Axons in posteriorer Richtung. Auf einer Breite von  $350 \mu\text{m}$  verzweigte sich das Axon mit 14 Knoten und die einzelnen Äste zogen breit aufgefächert parallel in posteriore Richtung (Abb. 4.28). Die Boutons befanden sich in den Schichten IV bis VI (IV: 12, V: 624, VI: 1) mit einer Dichte von 49 Boutons pro mm bei einer Gesamtlänge von 12,9 mm: Das Terminationsgebiet nahm ein Volumen von  $351 \mu\text{m}^3$  ein.



**Abbildung 4.24:** Komplettrekonstruktion von Axon 1 über 61 Gewebeschnitte. Die Ausdehnung in A-P-Richtung beträgt 4,5 mm und in M-L-Richtung 7,2 mm. Das Axon verzweigt sich in Schnitt 74 und tritt an drei unterschiedlichen Stellen in die graue Substanz ein. Dort bildet es 4 morphometrisch sehr unterschiedliche Terminationsfelder aus, die sich alle in Area 18 befanden. Die Anzahl der Boutons beträgt insgesamt 4878 auf die Schichten II bis VI verteilt. In den Gewebeübersichten ist die Position des Axons oder des Terminationsfeldes mit einem x gekennzeichnet. Um diese Position ebenfalls an den Zeichnungen sichtbar zu machen, wurde die Schnittnummer an den entsprechenden Abschnitt des Axons gesetzt.

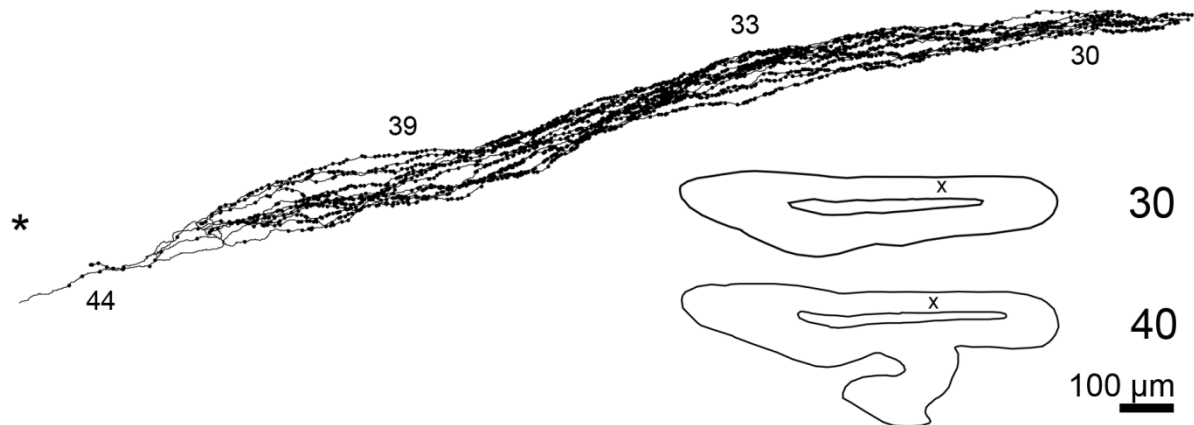


**Abbildung 4.25:** Detailansicht des ersten Terminationsfeldes (T1) von Axon 1. Nach dem Eintritt in die graue Substanz verzweigt sich das Axon in mehrere Seitenäste. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 4 Schnitte (240 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,1 mm und in M-L-Richtung von 0,4 mm. Aus einem Seitenast entspringt ein weiteres Terminationsfeld, welches weiter anterior liegt. Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung in Bereich dieses Terminationsfeldes konnte das Gebiet an 11 Stellen nicht vollständig rekonstruiert werden (markiert mit „+“). Es wurden 311 Boutons gezeichnet, die sich über die Schichten III bis VI erstrecken. Der Maßstab beträgt 100 µm.

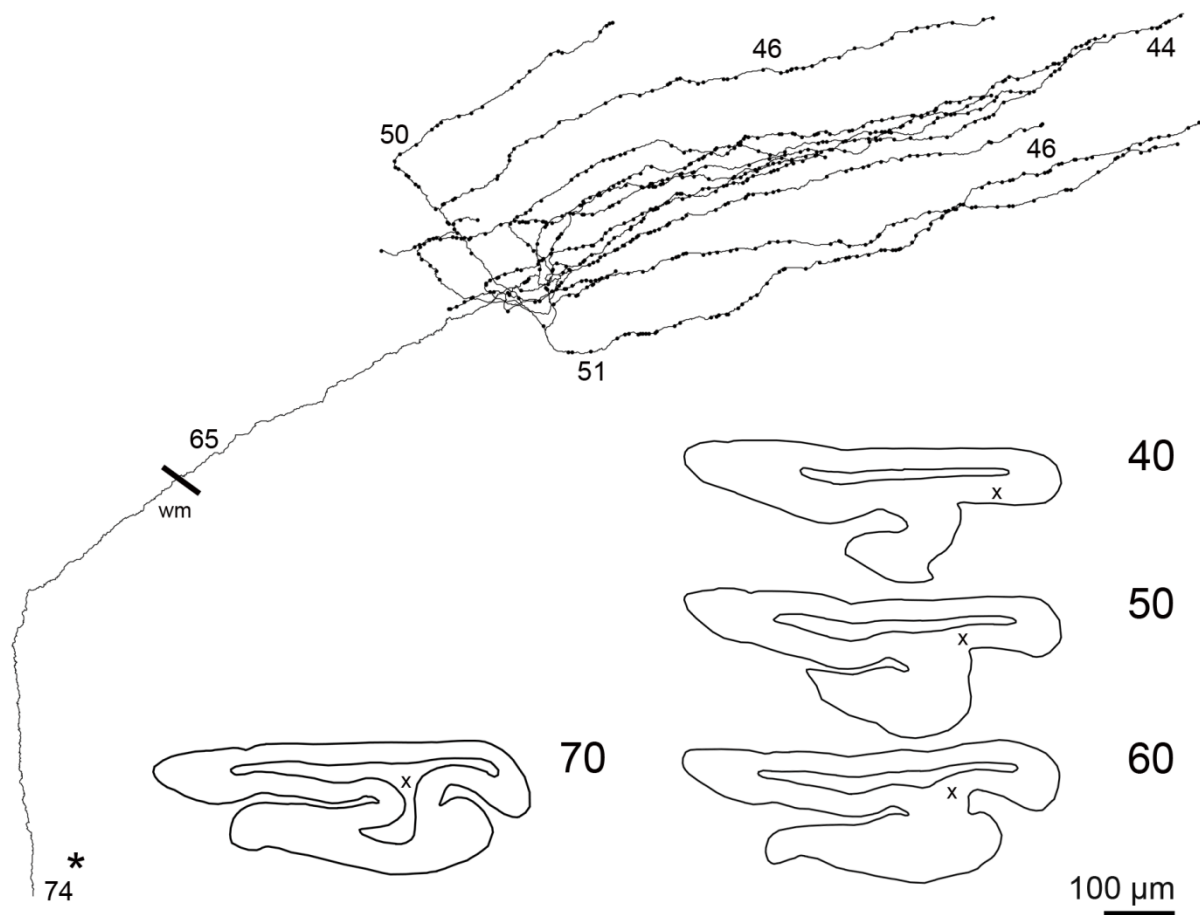


**Abbildung 4.26:** Detailansicht des zweiten Terminationsfeldes (T2) von Axon 1. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 21 Schnitte (1260 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,5 mm und in M-L-Richtung von 2,1 mm. Es wurden 1714 Boutons gezeichnet, die sich über die Schichten II bis VI erstrecken.





**Abbildung 4.27:** Detailansicht des dritten Terminationsfeldes (T3) von Axon 1. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 11 Schnitte (660 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 2,2 mm und in M-L-Richtung von 0,6 mm. Es wurden 2216 Boutons gezeichnet, die sich über die Schichten IV und V erstrecken.



**Abbildung 4.28:** Detailansicht des vierten Terminationsfeldes (T4) von Axon 1. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 30 Schnitte (1800 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,7 mm und in M-L-Richtung von 1,2 mm. Es wurden 637 Boutons gefunden, die sich über die Schichten IV bis VI verteilen.

#### 4.2.5.2 Axon 2

Das Axon 2 hatte eine Gesamtlänge von 24,8 mm verteilt über 11 Verzweigungsordnungen mit 26 Knotenpunkten. Es hatte eine Gesamtausdehnung von 7,5 mm in A-P-Richtung und 4 mm in M-L-Richtung und wurde über 46 Gewebeschnitte rekonstruiert. Die Anzahl der gefundenen Boutons betrug 931 bei einer durchschnittlichen Dichte von 38 Boutons pro mm. Diese Boutons verteilten sich auf 4 Terminationsgebiete, von denen sich drei Gebiete (T1, 2, 4) in Area 18 befanden und ein Gebiet (T3) in Area 17.

Der Startpunkt des Axons lag in Schnitt 104 bei einer Tiefe von 6240  $\mu\text{m}$  und zog 6184  $\mu\text{m}$  durch die weiße Substanz bis es sich in Schnitt 77 bei einer Tiefe von 4620  $\mu\text{m}$  zum ersten Mal verzweigte. Von dieser Verzweigung aus entstanden in anteriorer Richtung das erste Terminationsgebiet, in medialer Richtung das zweite und das dritte Terminationsgebiet und in posteriorer Richtung das vierte Gebiet. Die Gebiete T2 und T3 lagen auf dem gleichen Verzweigungsast, wurden aber durch ihre räumliche Trennung in zwei Gebiete aufgeteilt, was durch ihre unterschiedliche Arealzugehörigkeit (T2 befand sich in Area 18 und T3 in Area 17) bestätigt wurde (Abb. 4.29).

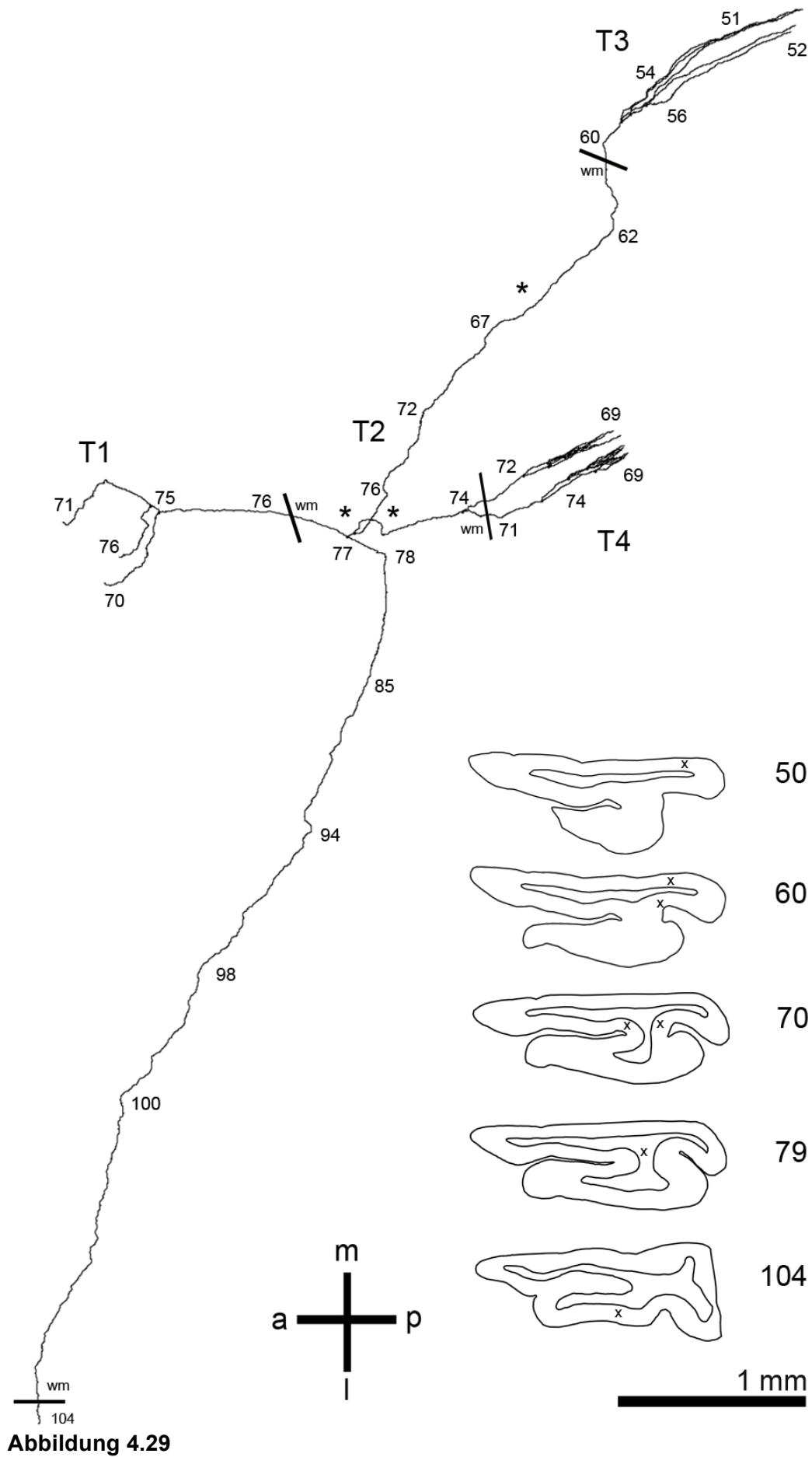
Das erste Terminationsgebiet (Abb. 4.30) zog 856,6  $\mu\text{m}$  in anteriore Richtung von seiner Abzweigung vom Hauptsegment aus, bis es sich innerhalb des Terminationsgebietes zweimal verzweigte. Es hatte eine Gesamtlänge von 2,7 mm mit 153 Boutons (Dichte 56/mm) und nahm ein Volumen von 122  $\mu\text{m}^3$  ein. Die Boutons befanden sich alle in Area 18 und waren auf folgende Schichten verteilt: Schicht III (n= 105), Schicht IV (n= 8) und Schicht V (n= 40).

Das Gebiet T2 umfasste 82 Boutons, die aufgrund ihrer räumlichen Abgrenzung zu den weiteren Terminationsgebieten zusammengefasst wurden. Die Boutons befanden sich auf unterschiedlichen Verzweigungsästen des Axons und lagen bei erster Betrachtung innerhalb der weißen Substanz (Abb. 4.29 und 4.31). Nach Abschluss der Rekonstruktion und Gegenfärbung der Gewebeschnitte mit Kresylviolett konnte jedoch festgestellt werden, dass sich diese Boutons und die dazugehörigen Verzweigungsäste in den Ausläufern von Schicht VI von Area 18 befanden. Zusammengefasst hatte das Gebiet eine Länge von 3,6 mm mit einer Boutondichte von 23 pro mm und nahm ein Volumen von 111  $\mu\text{m}^3$  ein.

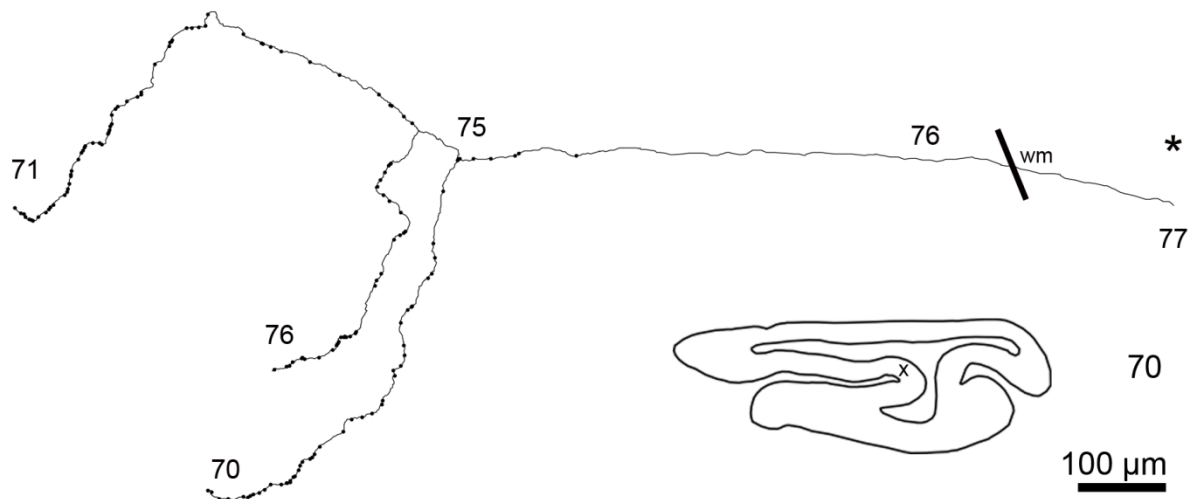
Das dritte Gebiet (T3) befand sich auf dem gleichen Verzweigungsast wie T2. Nach der Abgrenzung zog das Axonsegment in Schnitt 60 (entspricht einer Tiefe von 3600  $\mu\text{m}$ ) in die graue Substanz und verzweigte sich dort mehrfach (Abb. 4.32). Die entstandenen Äste zogen parallel in posterior-mediale Richtung bis zu einer Tiefe von 3060  $\mu\text{m}$ . Es entstand eine Gesamtlänge von 7,1 mm mit einer Boutondichte von 50 pro mm. Die 353 Boutons befanden sich in Area 17 in den Schichten IV bis VI (IV: 259, V: 79, VI:15). Im Vergleich zu

den anderen Terminationsgebieten von Axon 2 nahm das Gebiet T3 das größte Volumen von  $190 \mu\text{m}^3$  ein.

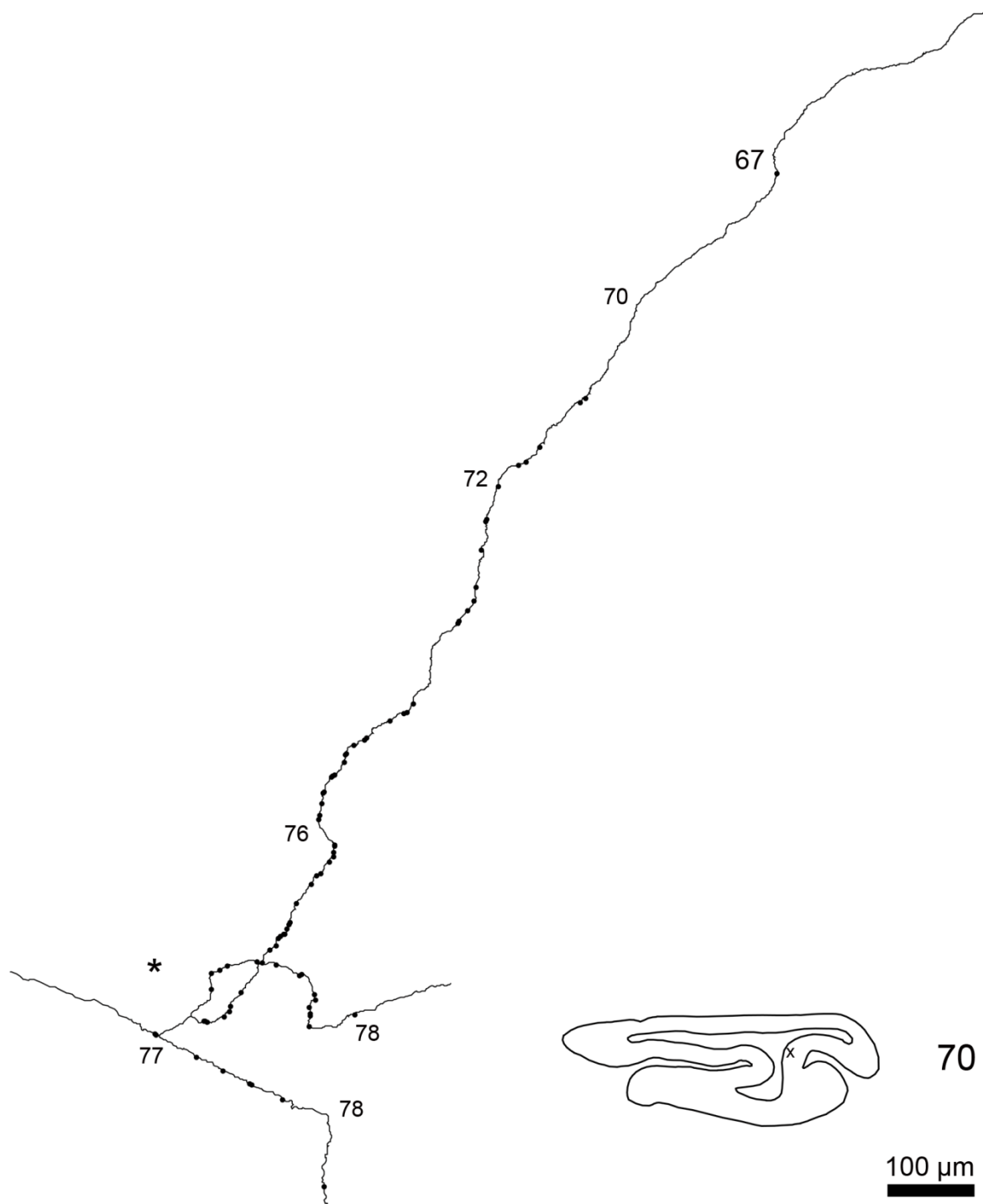
Das Gebiet T4 verzweigte sich nach  $308 \mu\text{m}$  noch innerhalb der weißen Substanz und trat erst danach in die graue Substanz von Area 18 ein. Es bildeten sich zwei parallel verlaufende Äste aus, die eine Gesamtlänge von  $6,2 \text{ mm}$  hatten und ein Volumen von  $167 \mu\text{m}^3$  einnahmen. Es wurden 343 Boutons (Dichte  $55/\text{mm}$ ) gezählt, die sich alle in Schicht VI befanden (Abb. 4.33). Die beiden Äste liefen parallel zur Kortexoberfläche.



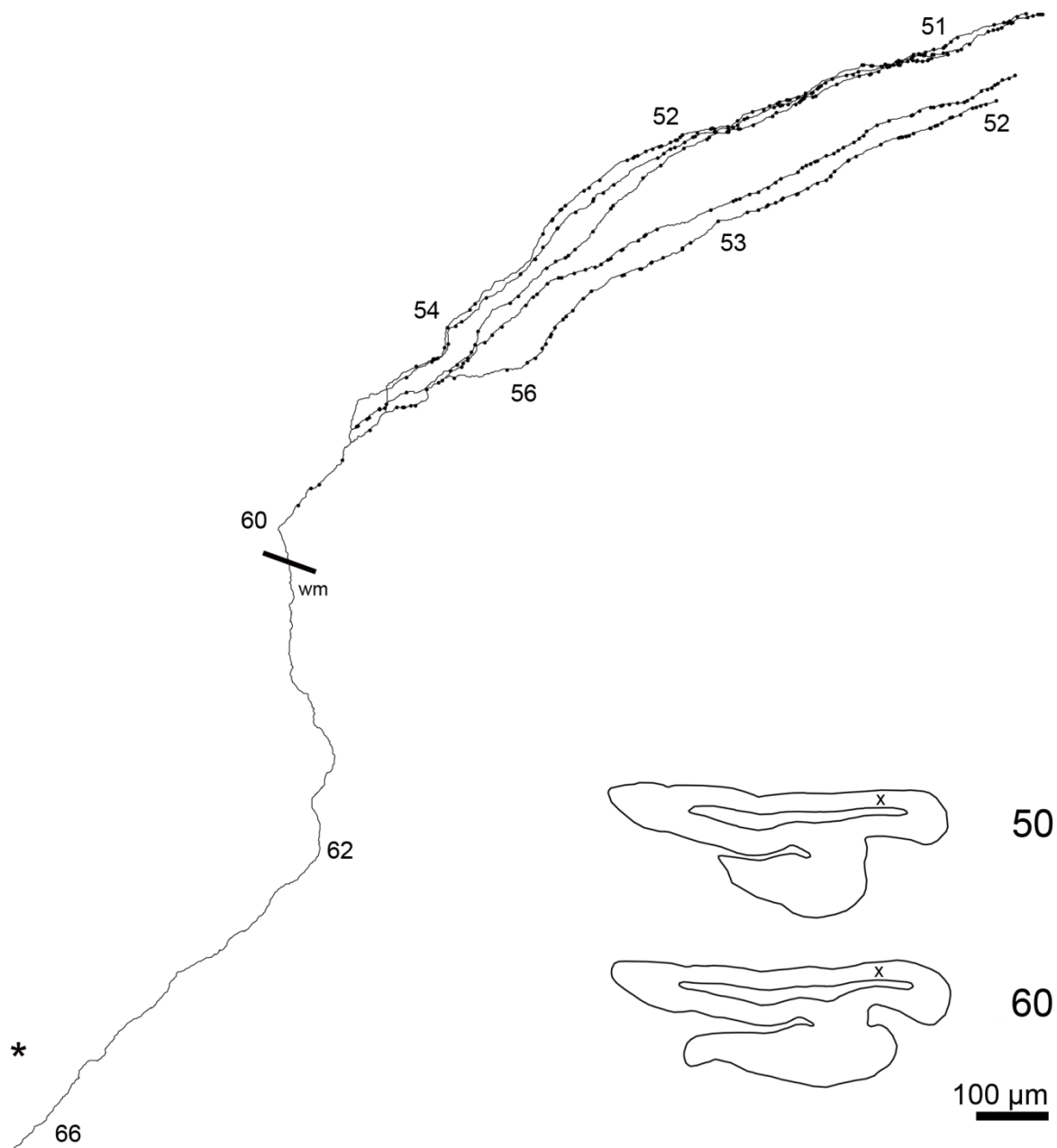
**Abbildung 4.29:** Komplettrekonstruktion von Axon 2 über 46 Schnitte. Die Ausdehnung in A-P-Richtung beträgt 7,5 mm und in M-L-Richtung 4 mm. Das Axon verzweigt sich in Schnitt 77 und tritt an drei unterschiedlichen Stellen in die graue Substanz ein. Es wurden 4 Terminationsgebiete rekonstruiert, die räumlich weit voneinander entfernt liegen.



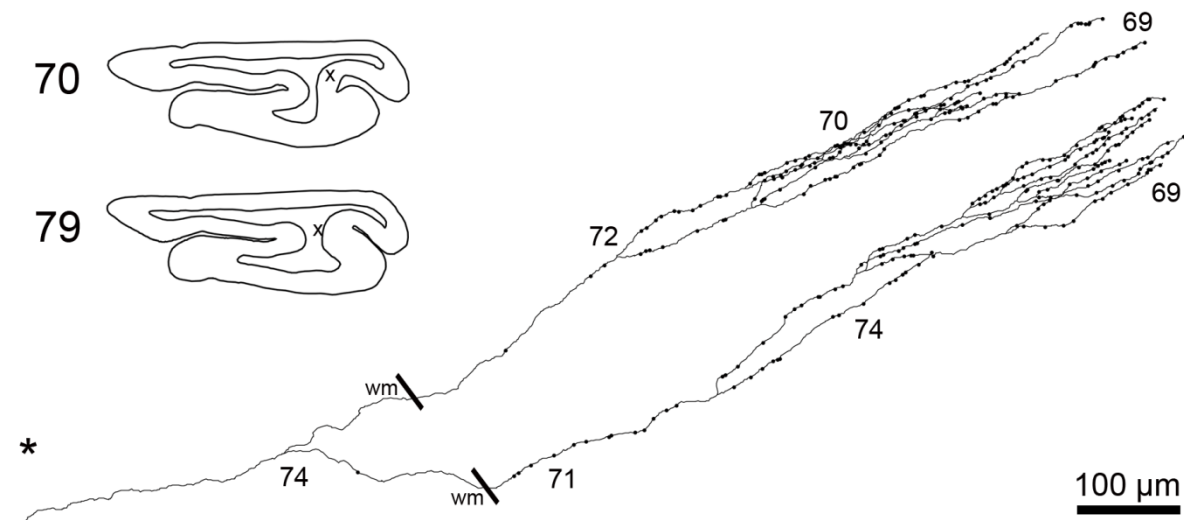
**Abbildung 4.30:** Detailansicht des ersten Terminationsfeldes (T1) von Axon 2. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 4 Schnitte (240 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,3 mm und in M-L-Richtung von 0,6 mm. Es wurden 153 Boutons gefunden, die sich über die Schichten III bis V verteilen. Nach dem Eintritt in die graue Substanz wurden auf dem Hauptast in der Nähe der ersten Verzweigung Boutons gefunden. Der größte Teil der Boutons verteilt sich jedoch auf die weiteren Verzweigungen.



**Abbildung 4.31:** Detailansicht des zweiten Terminationsfeldes (T2) von Axon 2. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 23 Schnitte (1380 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,2 mm und in M-L-Richtung von 1,9 mm. Es wurden 82 Boutons gefunden, die sich auf Schicht IV verteilen. Die Boutons wurden nur aufgrund ihrer räumlichen Nähe zusammengefasst und als eigenständiges Terminationsgebiet betrachtet.



**Abbildung 4.32:** Detailansicht des dritten Terminationsfeldes (T3) von Axon 2. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 16 Schnitte (960 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,4 mm und in M-L-Richtung von 1,6 mm. Es wurden 353 Boutons gefunden, die sich über die Schichten IV bis VI verteilen.



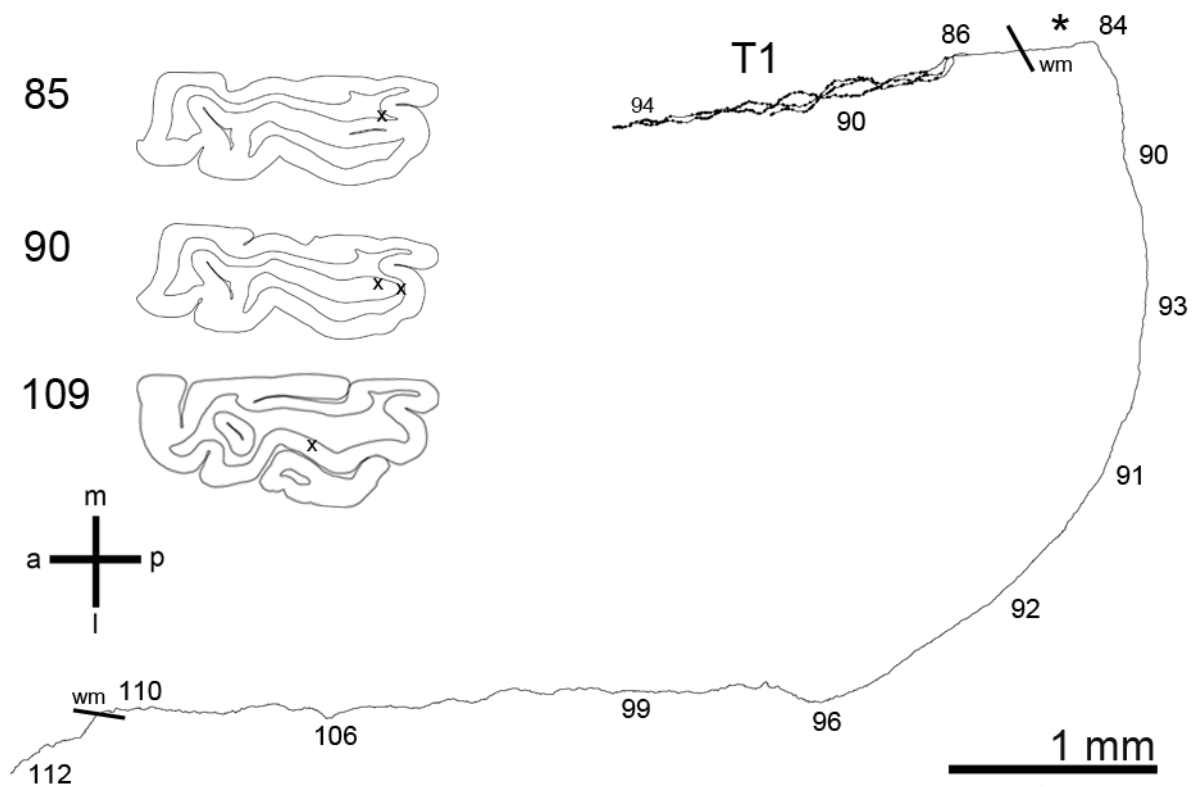
**Abbildung 4.33:** Detailansicht des vierten Terminationsfeldes (T4) von Axon 2. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 8 Schnitte (480 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,1 mm und in M-L-Richtung von 0,5 mm. Es wurden 343 Boutons gefunden, die sich auf Schicht IV verteilen. Nach der Abzweigung vom Hauptast, teilt sich das Axon innerhalb der weißen Substanz. Es bilden sich zwei Äste aus, die parallel zueinander und ebenfalls parallel zur Kortexoberfläche ziehen.

#### 4.2.5.3 Axon 3

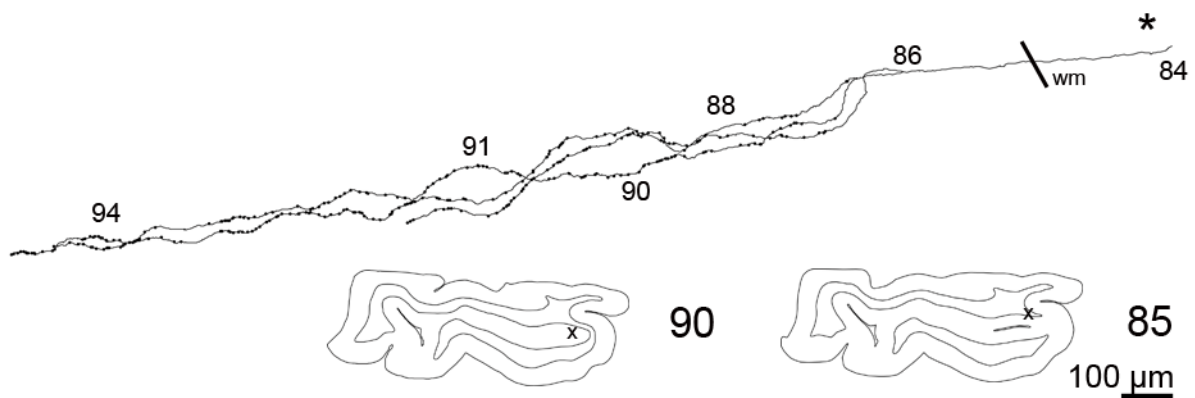
Die Rekonstruktion von Axon 3 erfolgte anhand der Schnittserie von Katze 4. Es hatte eine sehr einfache Struktur und zog von seiner Ursprungszelle in Schnitt 112 (Tiefe von 6720 µm) erst in posteriore Richtung um nach dem Eintritt in die graue Substanz ein Terminationsgebiet mit einem Volumen von 206 µm<sup>3</sup> auszubilden (Abb. 4.34). Das Axon hatte eine Ausdehnung von 5,5 mm in A-P-Richtung, von 3,6 mm in M-L-Richtung und umfasste 28 Schnitte in der Tiefe mit einer Gesamtlänge von 14,6 mm. Das Axon vollzog in Schnitt 84 einen fest rechtwinkligen Knick in anteriore Richtung. Dieser Knick wurde ausführlich untersucht und es konnten trotz der ungewöhnlichen Morphologie keine weiteren Verzweigungen gefunden werden.

Das ausgebildete Terminationsgebiet enthielt 284 Boutons, die sich mit einer durchschnittlichen Dichte von 50 Boutons pro mm auf einer Länge von 5,7 mm verteilten. Die Boutons lagen in den Schichten V und VI (V: 158, VI: 126) in Area 18 (Abb. 4.35).





**Abbildung 4.34:** Komplettrekonstruktion von Axon 3 über 28 Schnitte. Die Ausdehnung in A-P-Richtung beträgt 5,5 mm und in M-L-Richtung 3,6 mm. Das Axon verzweigt sich in Schnitt 86 und bildet ein Terminationsgebiet mit 284 Boutons aus.



**Abbildung 4.35:** Detailansicht des Terminationsgebietes von Axon 3. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 11 Schnitte (660 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 2,2 mm und in M-L-Richtung von 0,4 mm. Es wurden 284 Boutons gefunden, die sich über die Schichten V und VI verteilen.

#### 4.2.5.4 Axon 4

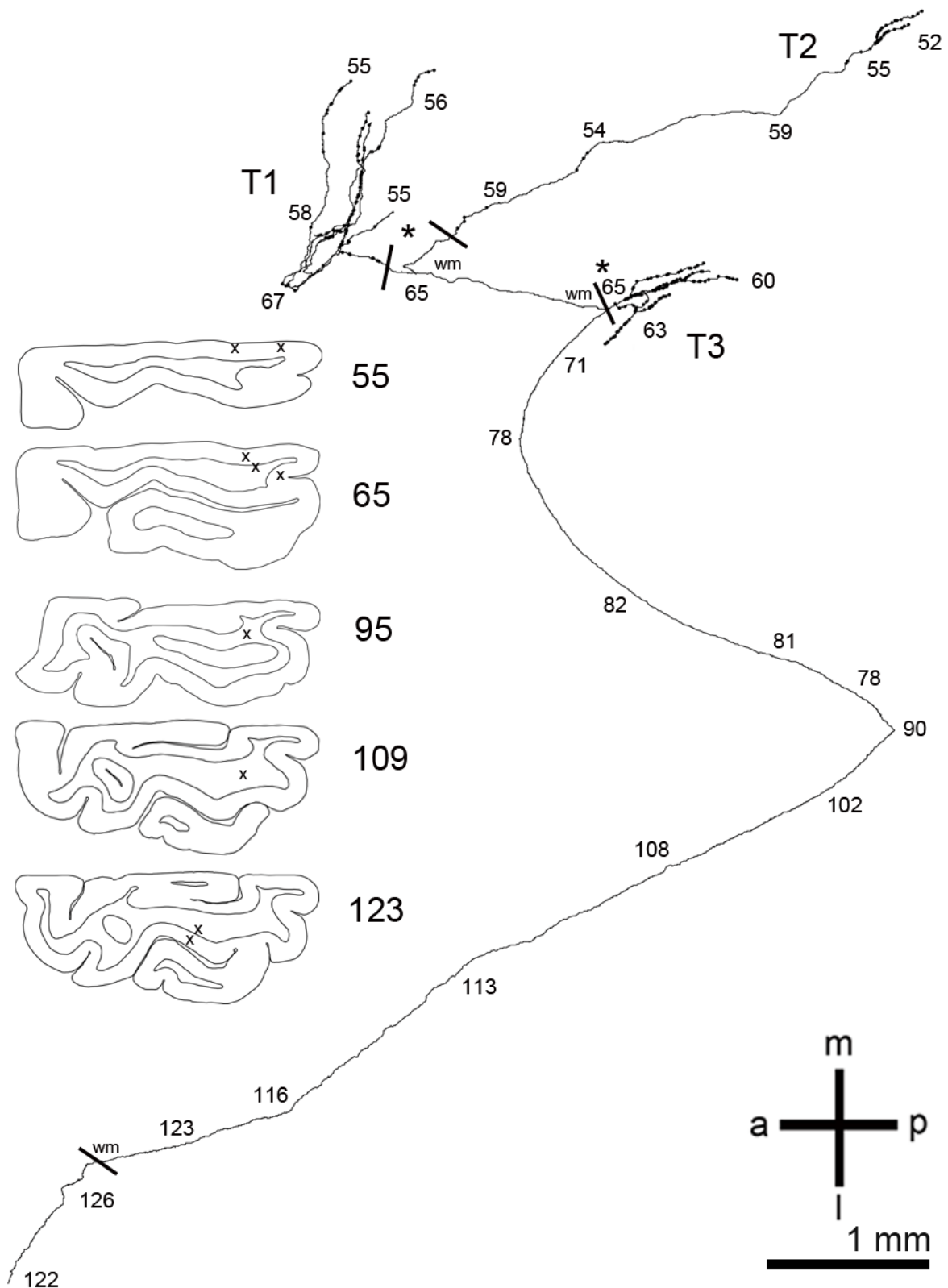
Das Axon 4 hatte eine Gesamtlänge von 30,4 mm verteilt über 8 Verzweigungsordnungen. Es hatte eine Gesamtausdehnung von 5,6 mm in A-P-Richtung und 7,9 mm in M-L-Richtung und wurde über 75 Gewebeschnitte rekonstruiert. Die Anzahl der gefundenen Boutons betrug 281 bei einer durchschnittlichen Dichte von 9 Boutons pro mm. Diese Boutons verteilten sich auf 3 Terminationsgebiete, von denen sich ein Gebiete(T3) in Area 18 befand und zwei Gebiete (T1, 2) in Area 17.

Das Ursprungsneuron von Axon 4 lag in einem Bereich mit sehr hoher Hintergrundfärbung direkt neben der Injektionsstelle, was eine genaue Zuordnung nicht möglich machte. Von diesem Punkt in Schnitt 122 aus, verließ das Axon in Schnitt 126 die graue Substanz von PMLS und zog 12 mm innerhalb der weißen Substanz bis es sich das erste Mal in Schnitt 65 verzweigte. Bis zu diesem Punkt hatte das Axon eine Distanz von 3,7 mm überwunden. An dieser Position zweigte sich in posteriore Richtung das Terminationsgebiet T3 ab. Weiter in anteriore Richtung verlaufend, zweigte sich in Schnitt 65 nach 1,2 mm in mediale Richtung das Gebiet T2 ab und nach anterior das Gebiet T1. Beide Gebiete befanden sich somit schon in Area 17 (Abb. 4.36).

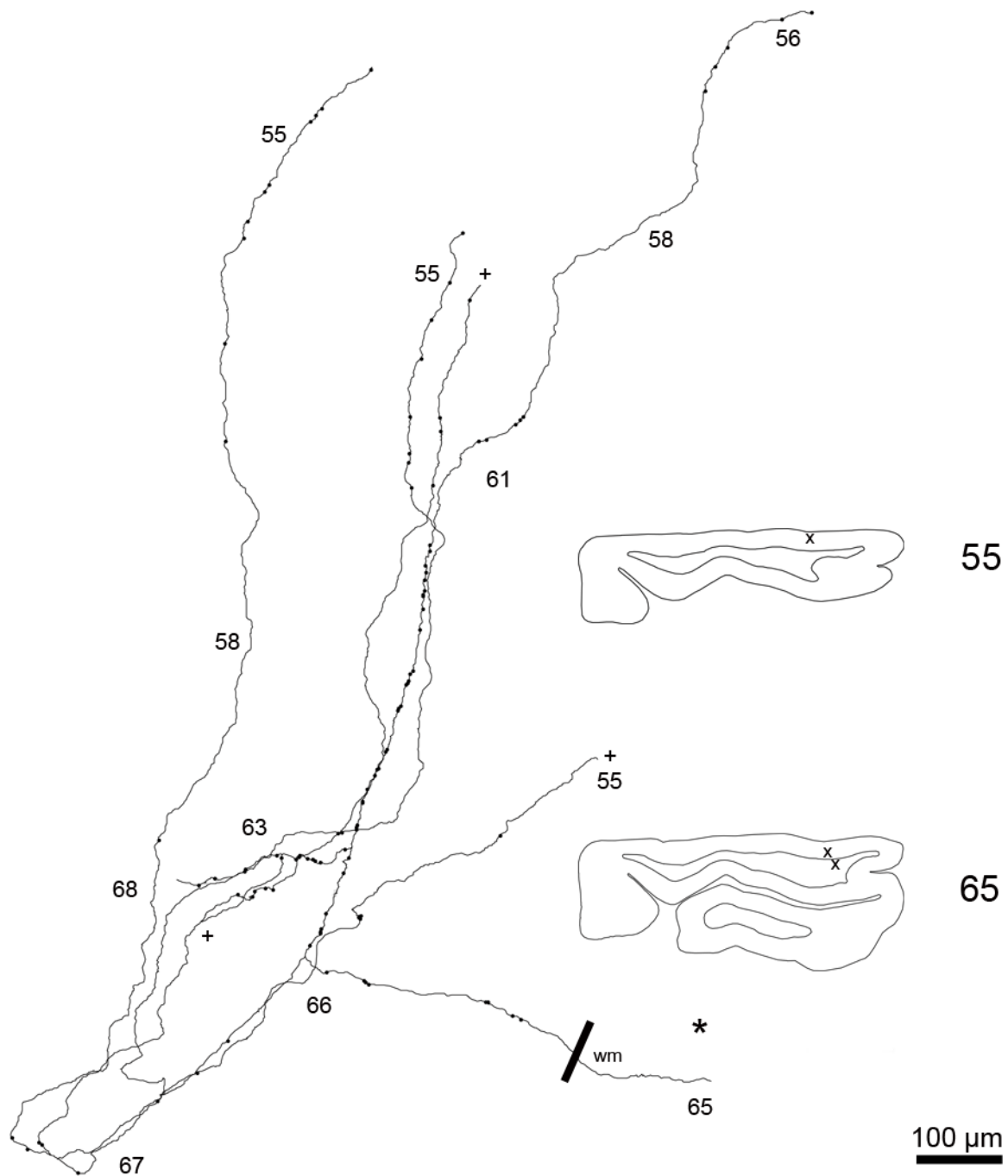
Das Gebiet T1 hatte insgesamt eine Gesamtlänge 8,9 mm. Nach dem Eintritt in die graue Substanz bildete das Axon mehrere Verzweigungsäste aus, die sich in mediale Richtung ausbreiteten. Es enthielt 114 Boutons mit einer Dichte von 13 Boutons pro mm. Die Boutons verteilten sich auf die Schichten IV (n= 35), V (n= 16) und VI (n= 63) und das Terminationsgebiet nahm ein Volumen von  $298 \mu\text{m}^3$  ein (Abb. 4.37).

Das Gebiet T2 zog nach Eintritt in die graue Substanz 4 mm in posterior-mediale Richtung und spaltete sich erst in Schnitt 55 in zwei Äste auf (Abb. 4.38). Die Gesamtlänge betrug 4,7 mm und es wurden 44 Boutons mit einer Dichte von 9 Boutons pro mm gezählt. Die Boutons befanden sich in den Schichten II+III (n= 13), IV (n= 24) und VI (n= 7) und das gesamte Terminationsgebiet nahm ein Volumen von  $301 \mu\text{m}^3$  ein.

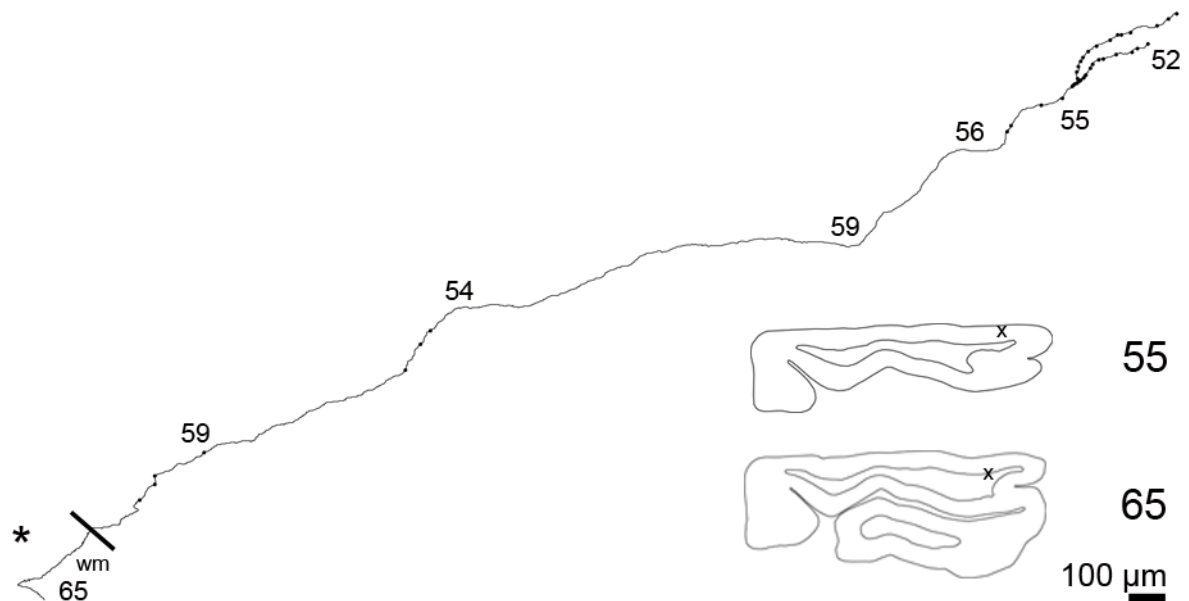
Das dritte Terminationsgebiet (T3) verzweigte sich nach Eintritt in die graue Substanz und bildete ein kompaktes aber breit aufgefächertes Feld aus (Abb. 4.39). Die Gesamtlänge betrug 3,3 mm und es befanden sich Boutons 123 mit einer Dichte von 38 Boutons pro mm auf den Terminalien. Alle Boutons lagen in Schicht VI (n= 123) und das komplette Gebiet nahm ein Volumen  $277 \mu\text{m}^3$  ein.



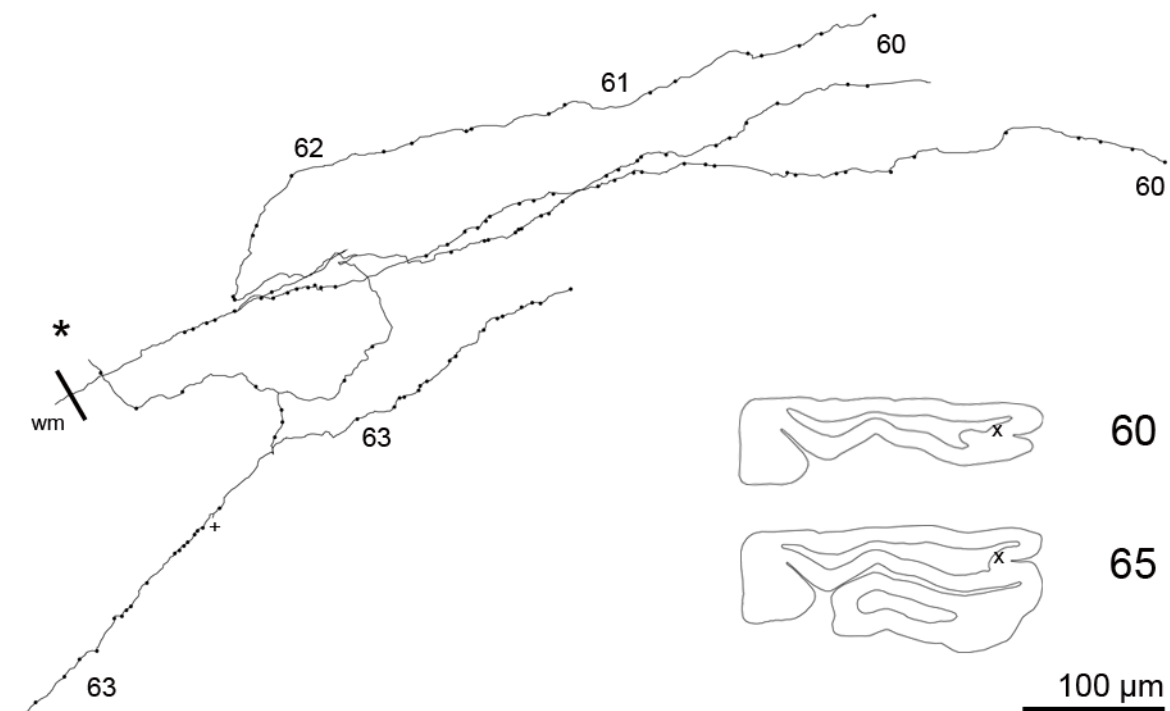
**Abbildung 4.36:** Komplettrekonstruktion von Axon 4 über 75 Schnitte. Die Ausdehnung in A-P-Richtung beträgt 5,6 mm und in M-L-Richtung 7,9 mm. Das Axon verzweigt sich erstmals in Schnitt 65 und bildet posterior der Verzweigungsstelle das Gebiet T3 aus. An der zweiten Verzweigung des Hauptastes ebenfalls in Schnitt 65 bildet sich in anteriorer Richtung das Gebiet T1 aus und in mediale Richtung das Gebiet T2.



**Abbildung 4.37:** Detailansicht des ersten Terminationsgebietes (T1) von Axon 4. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 14 Schnitte (840 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1 mm und in M-L-Richtung von 1,4 mm. Es wurden 114 Boutons gefunden, die sich über die Schichten IV bis VI verteilen. Nach dem Eintritt in die graue Substanz erfolgt eine breite Auffächerung des Terminationsfeldes, wobei zwei Äste nicht vollständig rekonstruiert werden konnten (markiert mit „+“).



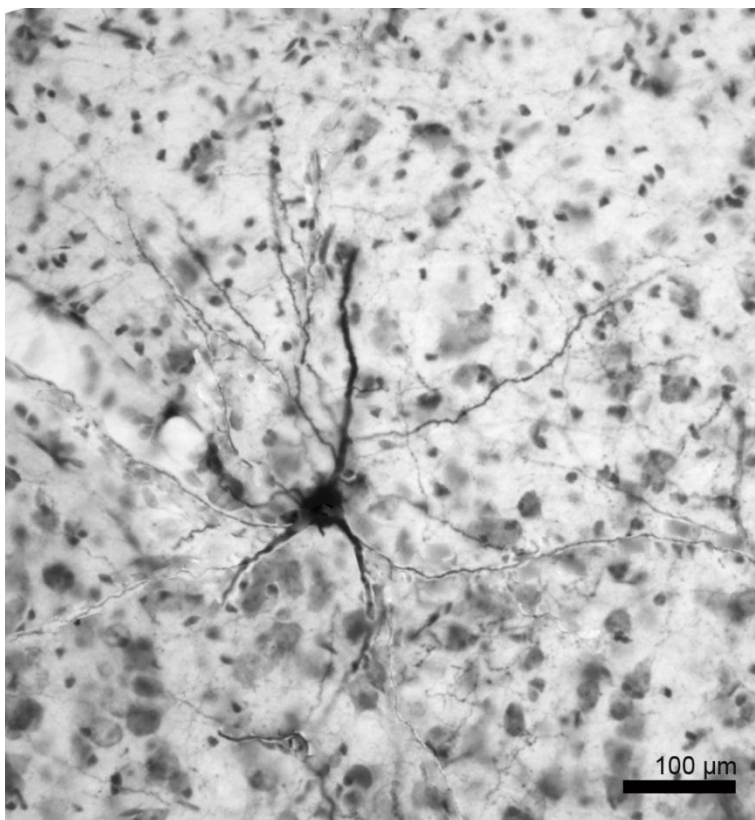
**Abbildung 4.38:** Detailansicht des zweiten Terminationsgebietes (T2) von Axon 4. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 14 Schnitte (840 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 3,2 mm und in M-L-Richtung von 1,6 mm. Es wurden 44 Boutons gefunden, die sich über die Schichten IV und VI verteilen. Das Axonsegment zieht erst 4 mm innerhalb der grauen Substanz bevor die ersten Boutons gefunden wurden und das Axonsegment sich verzweigt.



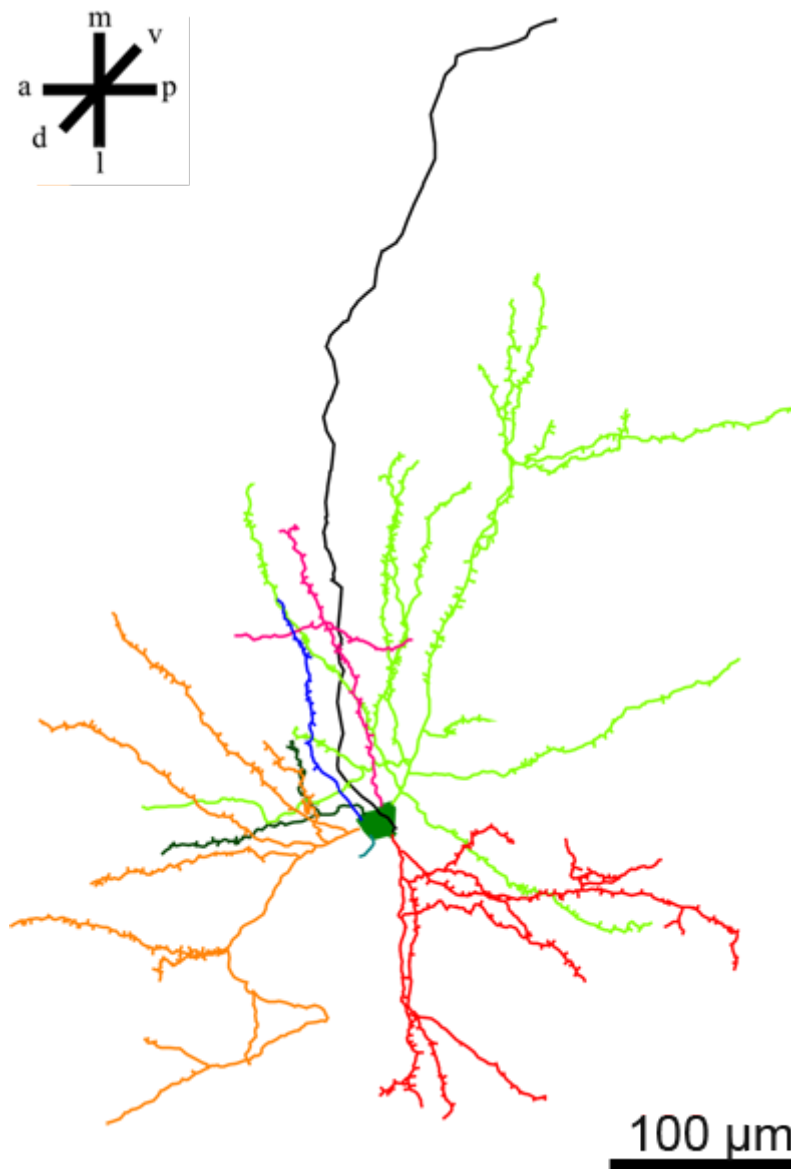
**Abbildung 4.39:** Detailansicht des dritten Terminationsgebietes (T3) von Axon 4. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 7 Schnitte (420 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 0,8 mm und in M-L-Richtung von 0,5 mm. Es wurden 123 Boutons gefunden, die sich alle in Schicht VI befinden.

#### 4.2.5.5 Axon 5

Das Axon 5 hatte eine Gesamtlänge von 28,5 mm, welche sich auf 9 Verzweigungsebenen verteilte. Insgesamt ließen sich 322 Boutons bestimmen, die sich auf 4 Terminationsfelder in Area 18 verteilten. Es hatte eine Gesamtausdehnung von 5 mm in A-P-Richtung und 6,8 mm in M-L-Richtung. Für die Rekonstruktion wurden 113 aufeinander folgende Horizontalschnitte verwendet, was eine Ausdehnung in der Z-Achse von 6,8 mm entsprach (Abb. 4.42). Aufgrund seines Startpunktes anterior zur Injektionsstelle konnte für das Axon das Ursprungsneuron gefunden und rekonstruiert werden (Abb. 4.40 und 4.41). Es handelt sich um eine exzitatorische Pyramidenzelle, die sich in Schicht VI von PMLS befand. Auf den Ästen der Basaldendriten und auf dem Apikaldendriten waren dendritische Dornen zu erkennen.



**Abbildung 4.40:** Mikroskopaufnahme des Ursprungsneurons von Axon 5. Das Bild wurde aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzt, da sich der Zellkörper sowie die Dendriten auf angrenzenden Schnitten befunden. Von links oben zieht ein Blutgefäß Richtung Bildmitte. Der Maßstab beträgt 100 µm.



**Abbildung 4.41:** Rekonstruktion des Ursprungsneurons von Axon 5. Es handelt sich um eine exzitatorische Pyramidenzelle. Der Apikaldendrit ist in hellgrün, die Basaldendriten in rot, orange, dunkelgrün, blau und pink dargestellt und das Axon ist in schwarz gezeichnet. Der Maßstab beträgt 100  $\mu\text{m}$ . Das Achsenkreuz gibt die Orientierung der Zeichnung an (a: anterior, d: dorsal, m: medial, l: lateral, p: posterior, v: ventral).

Von seinem Startpunkt in Schicht VI in Schnitt 147 aus, verlief das Axon 10,2 mm innerhalb der weißen Substanz, bis es in Schnitt 54 in die graue Substanz von Area 18 eintrat. Somit legte es in der z-Achse vom Ausgangspunkt bis zur Zielregion von 5,6 mm zurück. In Schnitt 50 verzweigte sich das Axon und bildete 4 Terminationsgebiete aus.

Das erste Terminationsgebiet (T1) hatte eine Gesamtlänge 7,9 mm, nahm ein Volumen  $929 \mu\text{m}^3$  ein und enthielt über mehrere weitläufige Äste insgesamt 130 Boutons mit einer Dichte von 16 Boutons pro mm. Die Boutons verteilten sich auf die Schichten IV ( $n=7$ ), V ( $n=25$ ) und VI ( $n=98$ ) (Abb. 4.43).

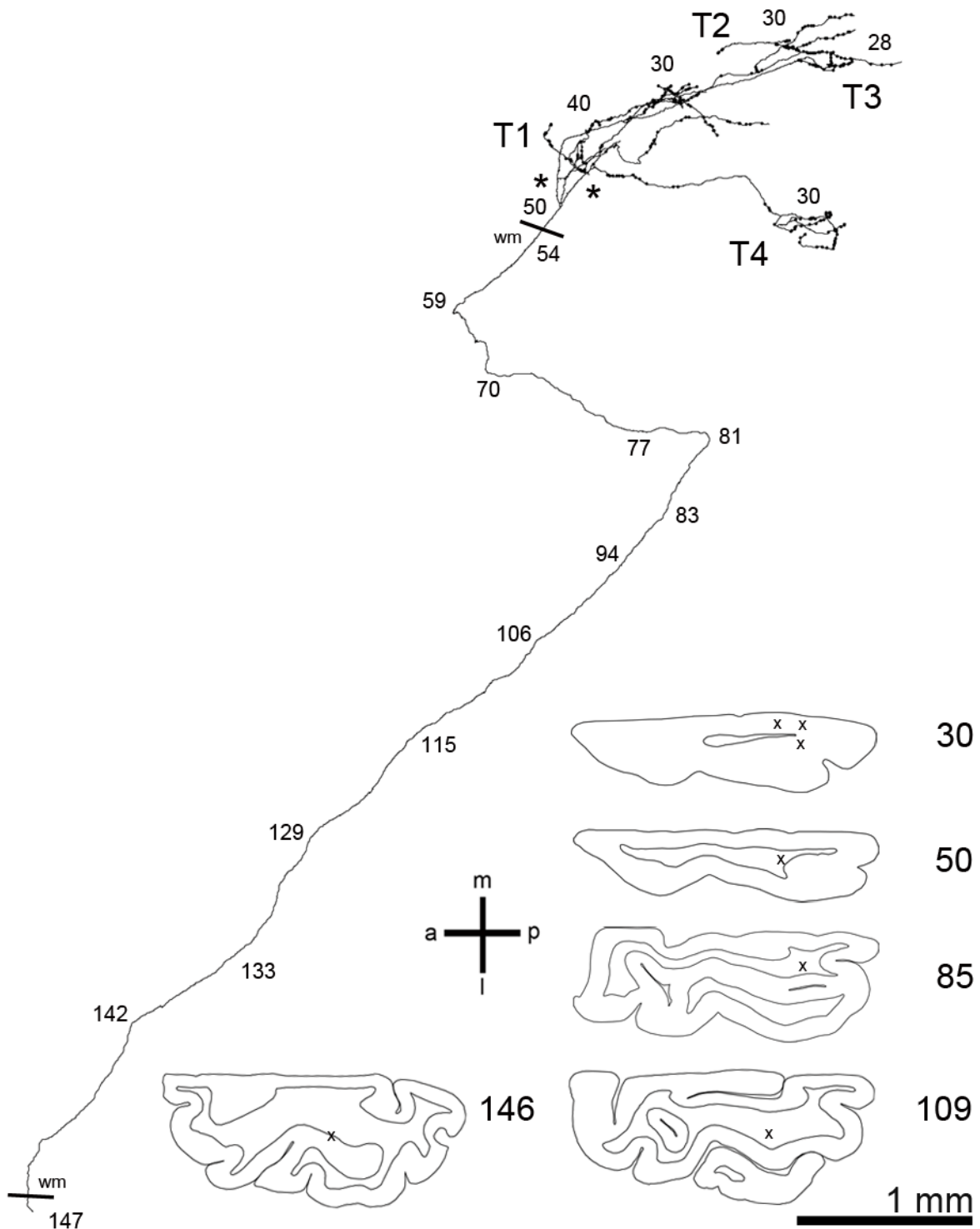
Das Gebiet T2 bildete seine ersten synaptischen Verknüpfungen neben dem Gebiet T1 aus, zog aber in seinem weiteren Verlauf in posterior-mediale Richtung. Es hatte eine

Gesamtlänge von 4,4 mm und nahm ein Volumen von  $508 \mu\text{m}^3$  ein. Es verteilten sich 82 Boutons mit einer Dichte von 19 Boutons pro mm auf das gesamte Terminationsgebiet. Die Boutons befanden sich in den Schichten IV ( $n=6$ ), V ( $n=43$ ) und VI ( $n=33$ ) (Abb. 4.44).

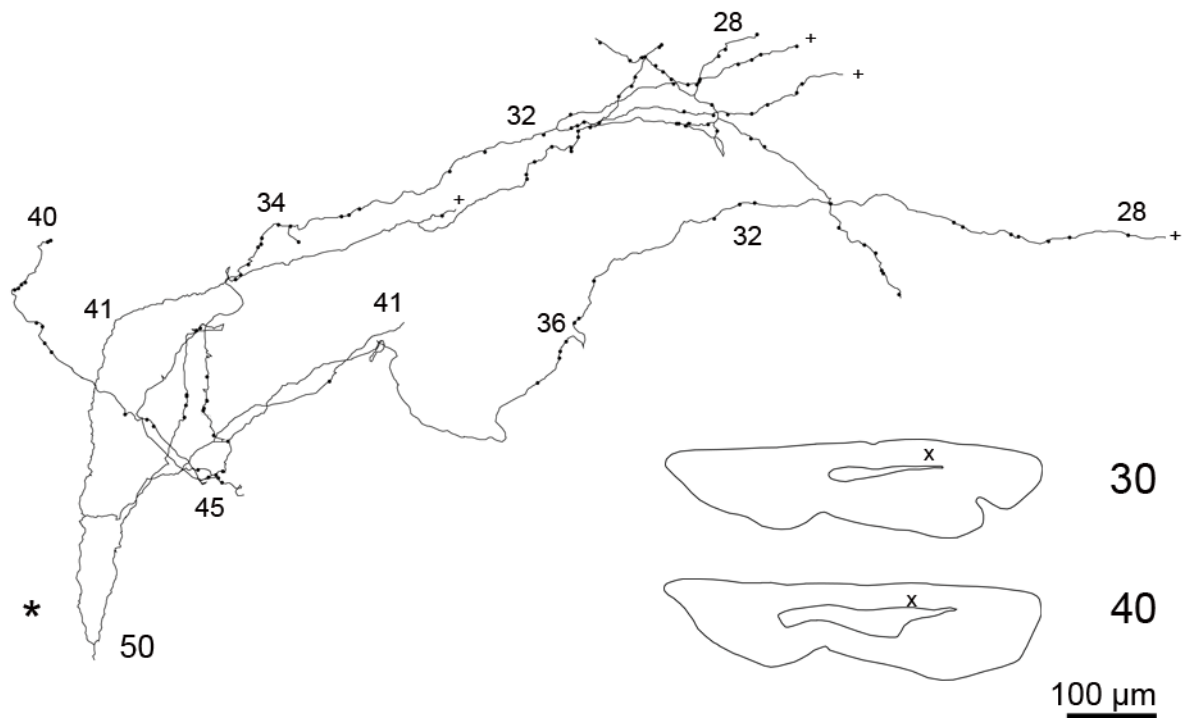
Das dritte Terminationsgebiet befand sich mit einer Länge 2 mm und einem Volumen von  $293 \mu\text{m}^3$  lateral von T2. Es wurden nur 35 Boutons im gefunden, die sich mit einer Dichte von 17 Boutons pro mm alle in Schicht VI ( $n=35$ ) befanden (Abb. 4.45).

Das letzte Gebiet (T4) spaltete sich vom ersten Ast von T2 ab und zog 1,5 mm in posteriore Richtung, um sich in Schnitt 33 zu verzweigen. Über die Schnitte 33 bis 28 bildete sich ein kompaktes Terminationsfeld mit einer Gesamtlänge 2 mm und einem Volumen von  $565 \mu\text{m}^3$  aus. Es verteilten sich 75 Boutons mit einer Dichte von 22 Boutons pro mm auf die Schichten II ( $n=1$ ), III ( $n=56$ ), V ( $n=2$ ) und VI ( $n=16$ ) (Abb. 4.46).

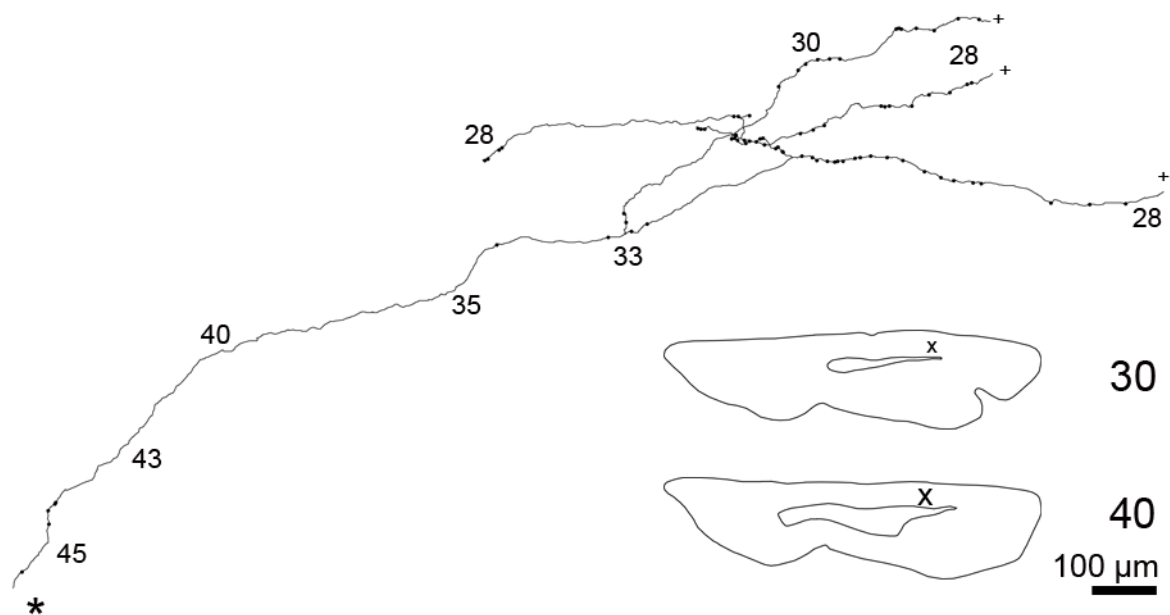




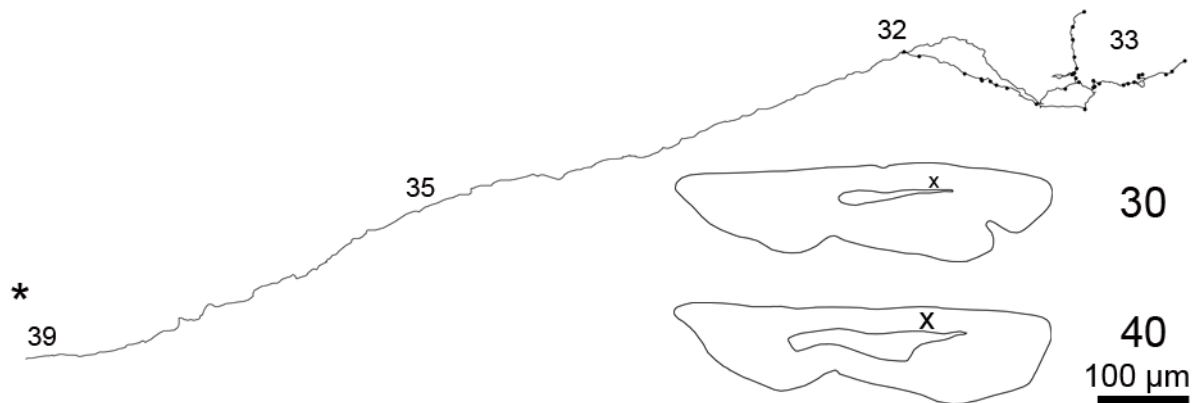
**Abbildung 4.42:** Komplettrekonstruktion von Axon 5 über 113 Schnitte. Die Ausdehnung in A-P-Richtung beträgt 5 mm und in M-L-Richtung 6,8 mm.



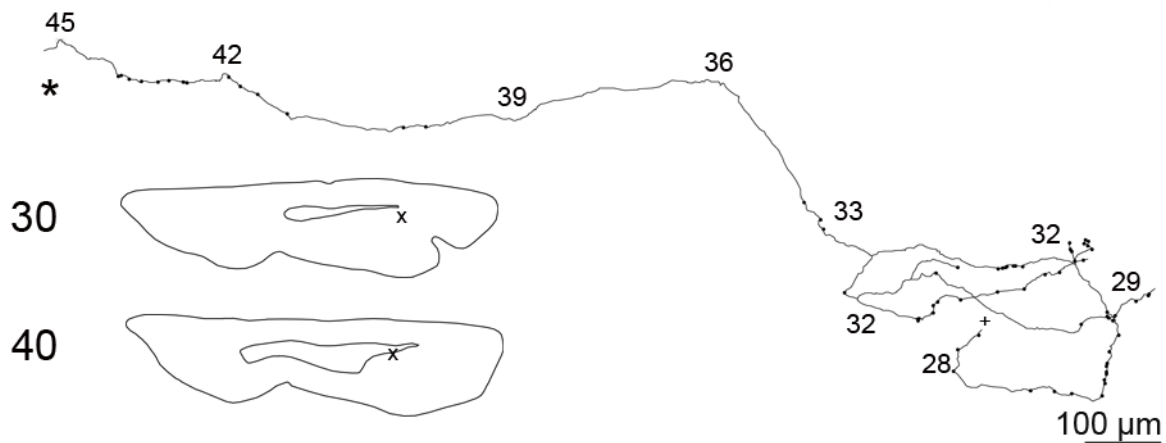
**Abbildung 4.43:** Detailansicht des ersten Terminationsgebietes (T1) von Axon 5. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 22 Schnitte (1320 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,3 mm und in M-L-Richtung von 0,7 mm. Es wurden 130 Boutons gefunden, die sich in den Schichten IV bis VI befinden.



**Abbildung 4.44:** Detailansicht des zweiten Terminationsgebietes (T2) von Axon 5. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 17 Schnitte (1020 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,8 mm und in M-L-Richtung von 0,9 mm. Es wurden 82 Boutons gefunden, die sich in den Schichten IV bis VI befinden.



**Abbildung 4.45:** Detailansicht des dritten Terminationsgebietes (T3) von Axon 5. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 8 Schnitte (480 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,3 mm und in M-L-Richtung von 0,4 mm. Es wurden 35 Boutons gefunden, die sich alle in Schicht VI befinden.



**Abbildung 4.46:** Detailansicht des vierten Terminationsgebietes (T4) von Axon 5. Das Gebiet erstreckt sich in der Tiefe über 18 Schnitte (1080 µm) und hat eine Ausdehnung in A-P-Richtung von 1,5 mm und in M-L-Richtung von 0,5 mm. Es wurden 75 Boutons gefunden, die sich in den Schichten II, III, V und VI befinden.

#### 4.2.5.6 Räumliche Anordnung der Axone

Die Axone 1 und 2 wurden anhand der Schnittserie von Katze 1 und die Axone 3 bis 5 anhand der Schnittserie von Katze 4 rekonstruiert. Dadurch war es möglich die jeweiligen Axone in einen räumlichen Zusammenhang zu stellen. Um die gesamte Komplexität der einzelnen Axone darzustellen, wurde für beide Schnittserien zuerst eine Aufsicht auf die Axone, dann eine frontale Ansicht und zum Abschluss eine Lateralansicht gewählt. Für die räumliche Darstellung der Axone relativ zur Kortexoberfläche wurden Filmsequenzen der verschiedenen Ansichten angefertigt. Eine Übersicht befindet sich in Kapitel 8.7.5 und die Filmsequenzen befinden sich auf der beigegeführten CD.

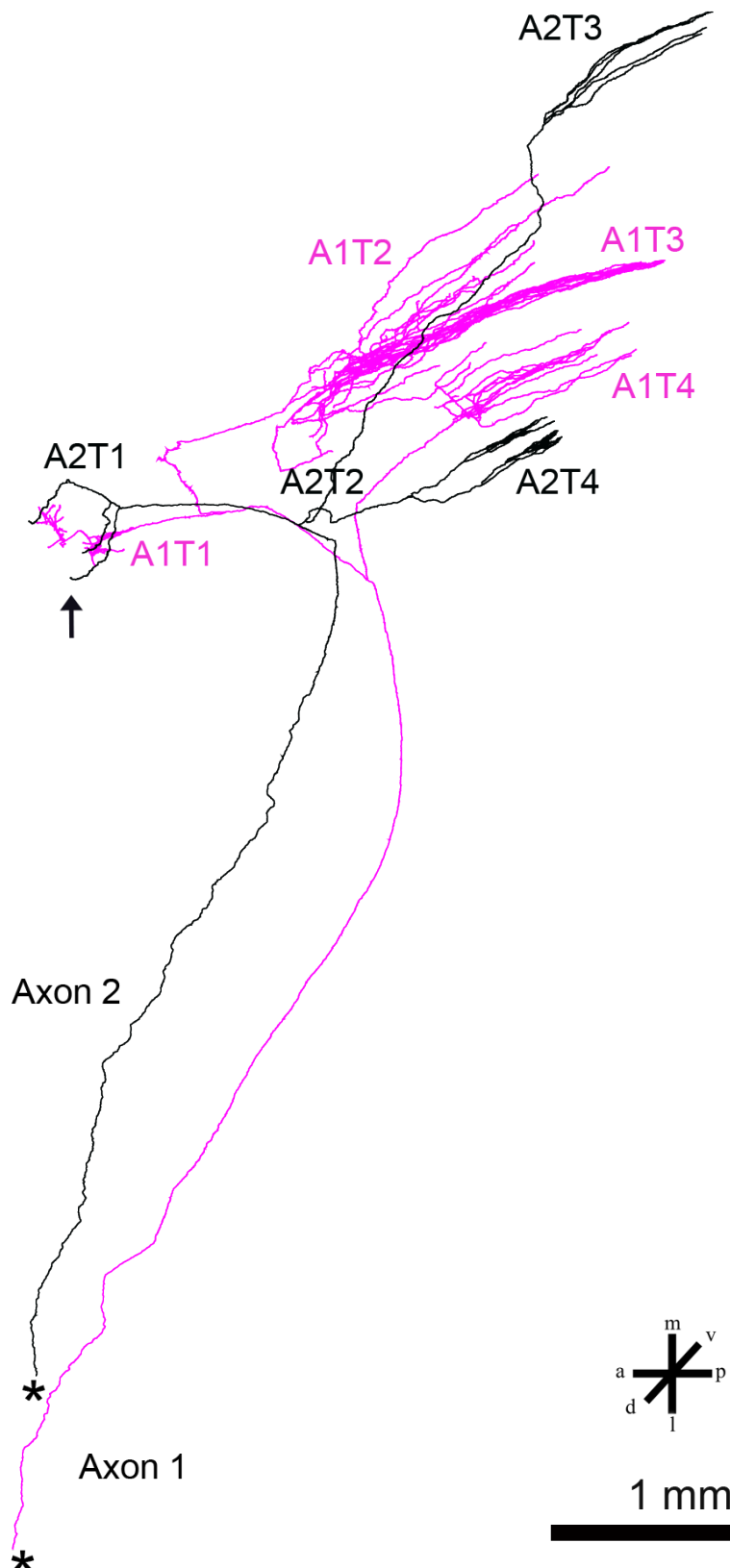
##### 4.2.5.6.1 Axon 1 und 2

In der Aufsicht auf die Axone 1 und 2 ließ sich erkennen, dass sich die Terminationsgebiete von beiden Axonen in sehr ähnlichen Bereichen ausbildeten, wobei das Gebiet T2 von Axon 2 weiter in mediale Richtung zog (Abb. 4.47). Dies wurden durch die

Zuordnung der Terminationsgebiet anhand der Färbung mit Kresylviolett bestätigt, da nur das Gebiet T2 sich in Area 17 befand, alle weiteren Terminationsgebiete lagen in Area 18.

In der Frontalansicht war ein unsteter Verlauf von Axon 1 zwischen dem Startpunkt in PMLS (rechte Bildseite) und seinen Terminationsfeldern erkennbar (Abb. 4.48). Dies kam durch Schnittfragmente zustande, die bei der Anfertigung der Gewebeschnitte entstanden. Dabei wurde im Bereich der Rekonstruktion das Gewebe nicht mit einer Schnittdicke von 60 µm geschnitten und es befanden sich dort Gewebebereiche von mehreren Schnitten mit einer entsprechend höheren Schnittdicke. Innerhalb der Rekonstruktion konnte der gesamte Bereich aber nur einer Ebene in der z-Achse zugeordnet werden, was nach der Zusammenfügung der Axonsegmente einen Sprung in der Z-Achse führte. Die Behebung dieses Sprunges, also eine Zuordnung der Axonsegmente zu den entsprechenden Ebenen in der Rekonstruktion, war im Programm Neurolucida nicht möglich.

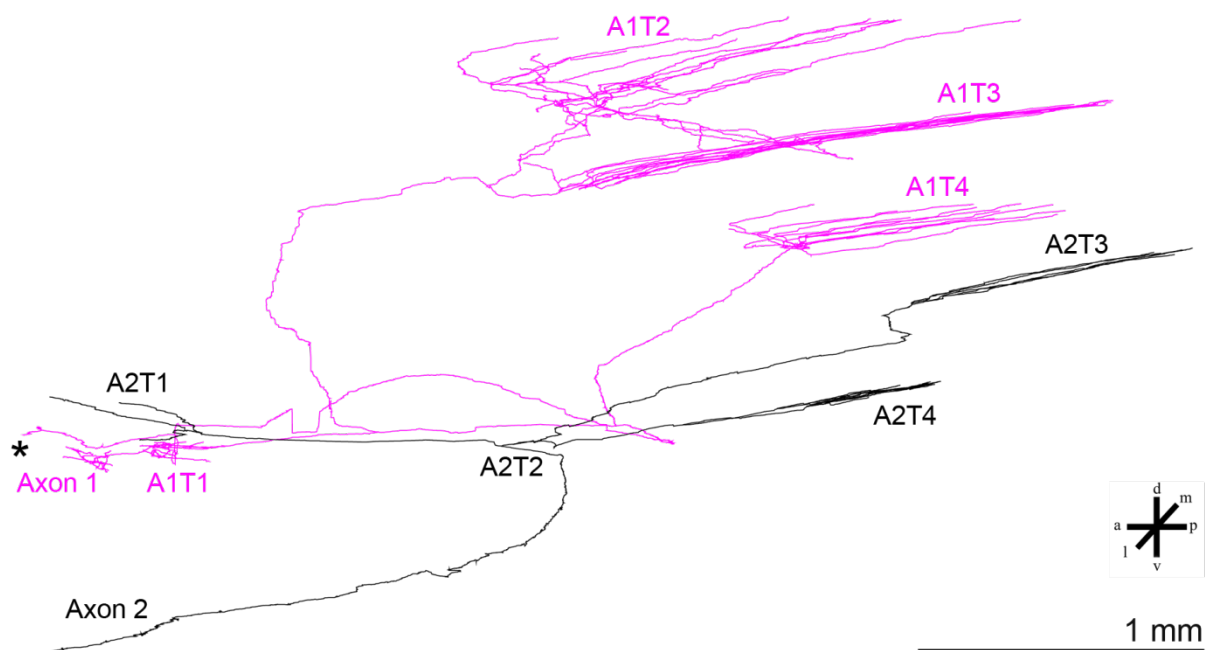
Ebenfalls ließ sich in der Frontalansicht und auch in der Lateralansicht (Abb. 4.49) erkennen, dass 3 von 4 Terminationsgebieten von Axon 1 dorsal zu denen von Axon 2 lagen und eine größere Fläche im Gewebe einnahmen. Es ist aber trotzdem bemerkenswert, dass beide Axone in diesem Bereich die gleichen a-p-elongierten Fasern der Terminationsgebiete aufweisen. Nur die Gebiete T1 von Axon 1 und Axon 2 befanden sich an der gleichen Position im Gewebe und beeinflussten somit einen angrenzenden Bereich. Bei der Betrachtung der Boutonverteilung (Tab. 15 im Anhang) dieser beiden Gebiete war auffällig, dass sie zusammen das Gewebe gleichmäßig über die Schichten III bis V erreichten (Axon 1 T1: III: 2, IV: 177, V:108, VI:24 und Axon 2 T1: III: 105, IV:8, V: 40), wobei Axon 1 eher in die Schichten IV bis VI und Axon 2 in Schicht III projizierte.



**Abbildung 4.47:** Aufsicht auf die Axone 1 (rosa) und 2 (schwarz). Der Startpunkt jedes Axons wurde mit einem Stern (\*) markiert und befand sich in PMLS. Der Pfeil zeigt den Überlappungsbereich von Axon 1 und 2. Der Maßstab rechts unten beträgt 1 mm. Das Achsenkreuz gibt die Orientierung der Zeichnung an (a: anterior, d: dorsal, m: medial, l: lateral, p: posterior, v: ventral).



**Abbildung 4.48:** Frontalansicht der Axone 1 (rosa) und 2 (schwarz). Der Startpunkt der Axone wurde mit einem Stern (\*) markiert und befand sich in PMLS. Der Maßstab beträgt 1 mm. Das Achsenkreuz gibt die Orientierung der Zeichnung an (a: anterior, d: dorsal, m: medial, l: lateral, p: posterior, v: ventral).

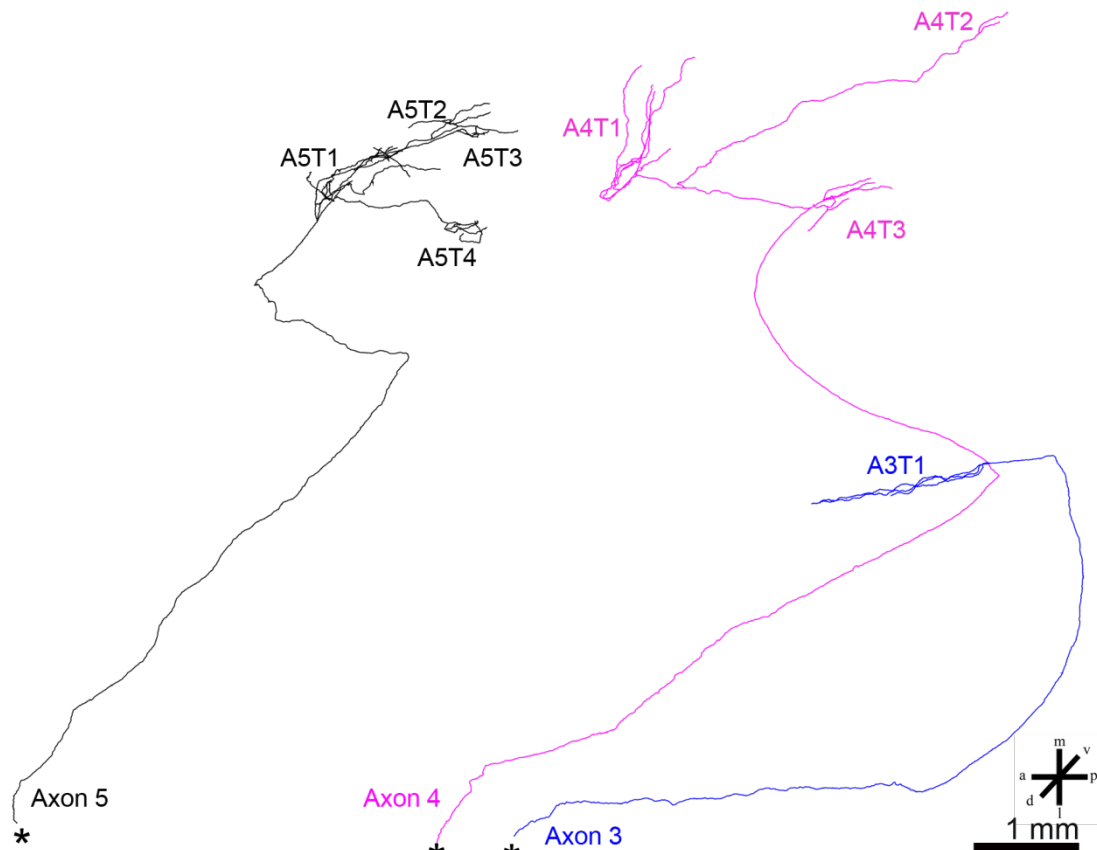


**Abbildung 4.49:** Lateralansicht der Axone 1 (rosa) und 2 (schwarz). Der Startpunkt der Axone wurde mit einem Stern (\*) markiert und befand sich in PMLS. Der Maßstab rechts unten beträgt 1 mm. Das Achsenkreuz gibt die Orientierung der Zeichnung an (a: anterior, d: dorsal, m: medial, l: lateral, p: posterior, v: ventral).

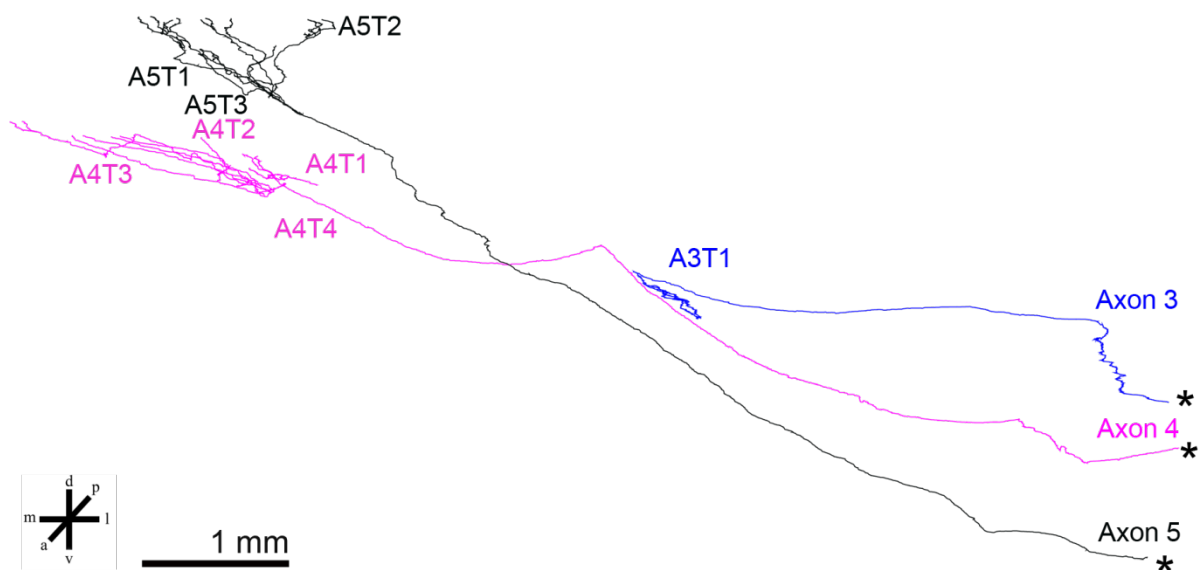
#### 4.2.5.6.2 Axon 3, 4 und 5

Die Axone 3 bis 5 nahmen unterschiedliche Positionen im Gewebe ein, was sich durch die abweichenden Startpunkte der Axone in PMLS und die Lage der Terminationsfelder in Area 17 und 18 verdeutlichte. Ebenfalls waren keine Überlappungen von Terminationsgebieten zwischen den Axonen erkennbar (Abb. 4.50). Der Abstand der Startpositionen von Axon 3 zu Axon 4 betrug  $\sim 770 \mu\text{m}$  und von Axon 3 zu Axon 5 betrug der Abstand  $\sim 4,8 \text{ mm}$ . Das sehr einfach aufgebaute Axon 3 bildete sein Terminationsfeld weit in ventraler und lateraler Richtung zu den Feldern der Axonen 4 und 5 aus. Axon 4 zeigte eine große Ausdehnung im Gewebe, was durch eine große Distanz zwischen den einzelnen Terminationsgebieten erkennbar war. Die Gebiete T 1 und 2 von Axon 4 lagen soweit medial und wurden anhand der Nissl-Färbung Area 17 zugeordnet. Axon 5 zeigte in

der Frontalansicht eine Auffächerung der Terminationsgebiete in dorsale Richtung (Abb. 4.51).



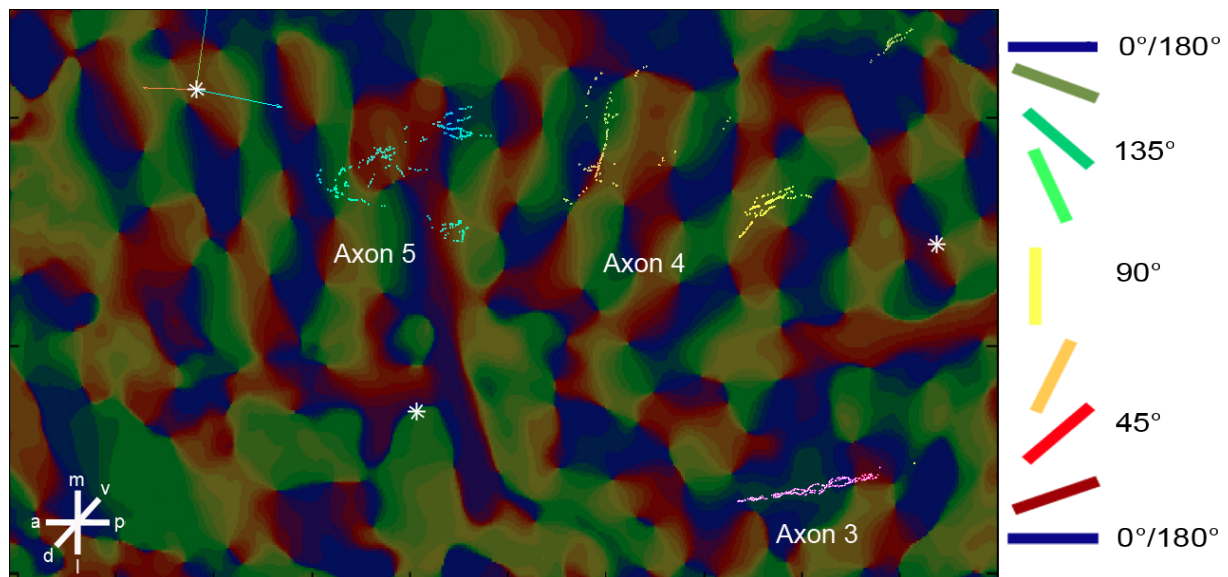
**Abbildung 4.50:** Aufsicht auf die Axone 3 (dunkelblau), 4 (rosa) und 5 (schwarz). Der Startpunkt der Axone wurde mit einem Stern (\*) markiert und befand sich in PMLS. Der Maßstab rechts unten beträgt 1 mm. Das Achsenkreuz gibt die Orientierung der Zeichnung an (a: anterior, d: dorsal, m: medial, l: lateral, p: posterior, v: ventral).



**Abbildung 4.51:** Frontalansicht der Axone 3 (dunkelblau), 4 (rosa) und 5 (schwarz). Maßstab 1mm. Das Achsenkreuz gibt die Orientierung der Zeichnung an (a: anterior, d: dorsal, m: medial, l: lateral, p: posterior, v: ventral).

#### 4.2.6 ÜBERLAGERUNG DER AXONREKONSTRUKTIONEN MIT DEN FUNKTIONELLEN KARTEN

Die Zusammenführung der Axonrekonstruktionen von Katze 4 und der funktionellen Winkelkarten erfolgte, wie beschrieben über die gesetzten Elektrodenmarkierungen (Abb. 3.7). Es konnten die Pixelposition jedes Boutons innerhalb der Winkelkarte bestimmt werden und über ein von uns entwickeltes MatLab-Programm der entsprechende Orientierungswinkel (beziehungsweise die Farbcodierung des jeweiligen Winkels) dem Bouton zugeordnet werden (Abb. 4.52). Somit konnten die funktionellen Eigenschaften der Bereiche, in denen die Boutons der einzelnen Terminationsgebiete zu liegen kamen, bestimmt werden. Über diese Zuordnung der Orientierungen war es ersichtlich, wie die rekonstruierten Axone mit ihren Terminationen in die Verarbeitung der eintreffenden Informationen im primären visuellen Kortex eingriffen. Für die genauere Darstellung wurden die Daten der Boutons im nächsten Abschnitt statistisch aufgearbeitet.



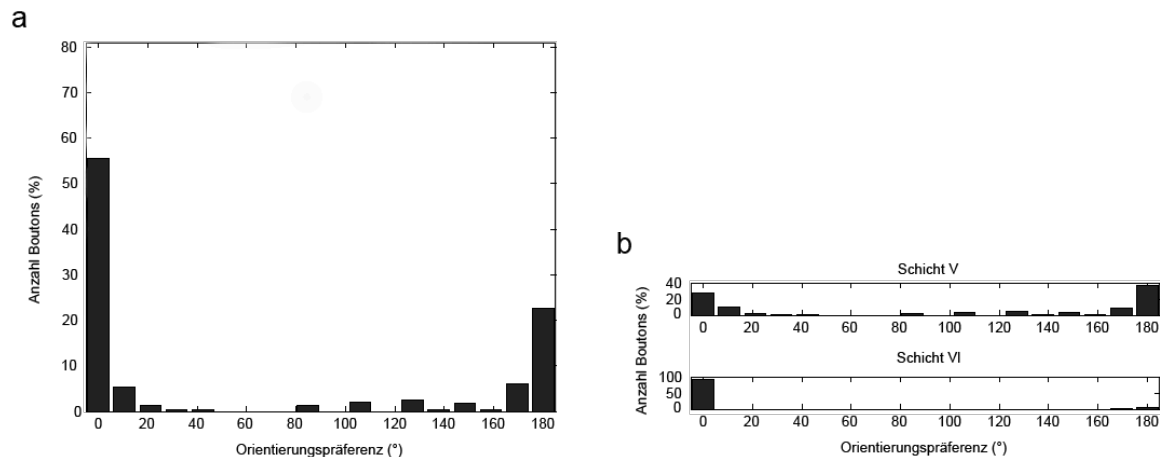
**Abbildung 4.52:** Overlay der funktionellen Karte und der Boutons der Axone 3, 4 und 5 von Katze 4. Jeder Bouton wurde aufgrund seiner Axonzugehörigkeit und seiner Lage in einer kortikalen Schicht einer entsprechenden Farbe zugeordnet. Die weißen Sterne geben die Position der Referenzmarkierungen der Elektroden an. Rechts ist die Farbcodierung der Winkelkarte dargestellt. Das Achsenkreuz gibt die Orientierung der Zeichnung an (a: anterior, d: dorsal, m: medial, l: lateral, p: posterior, v: ventral).

#### 4.2.7 ORIENTIERUNGSSPEZIFITÄT DER BOUTONS

Nach der Zuordnung der Winkelinformationen zu den Positionen der Boutons der einzelnen Terminationsgebiete wurden die Ergebnisse mit einer Rasterung („binning“) von je 10° zusammengefasst und die Verteilung über die einzelnen Orientierungspräferenzen prozentual dargestellt. Anhand des genauen Alignments der Winkelkarte mit der dreidimensionalen Rekonstruktion, war es ebenfalls möglich, die Daten der Boutons ebenfalls nach ihrer Schichtzugehörigkeit aufzutrennen.



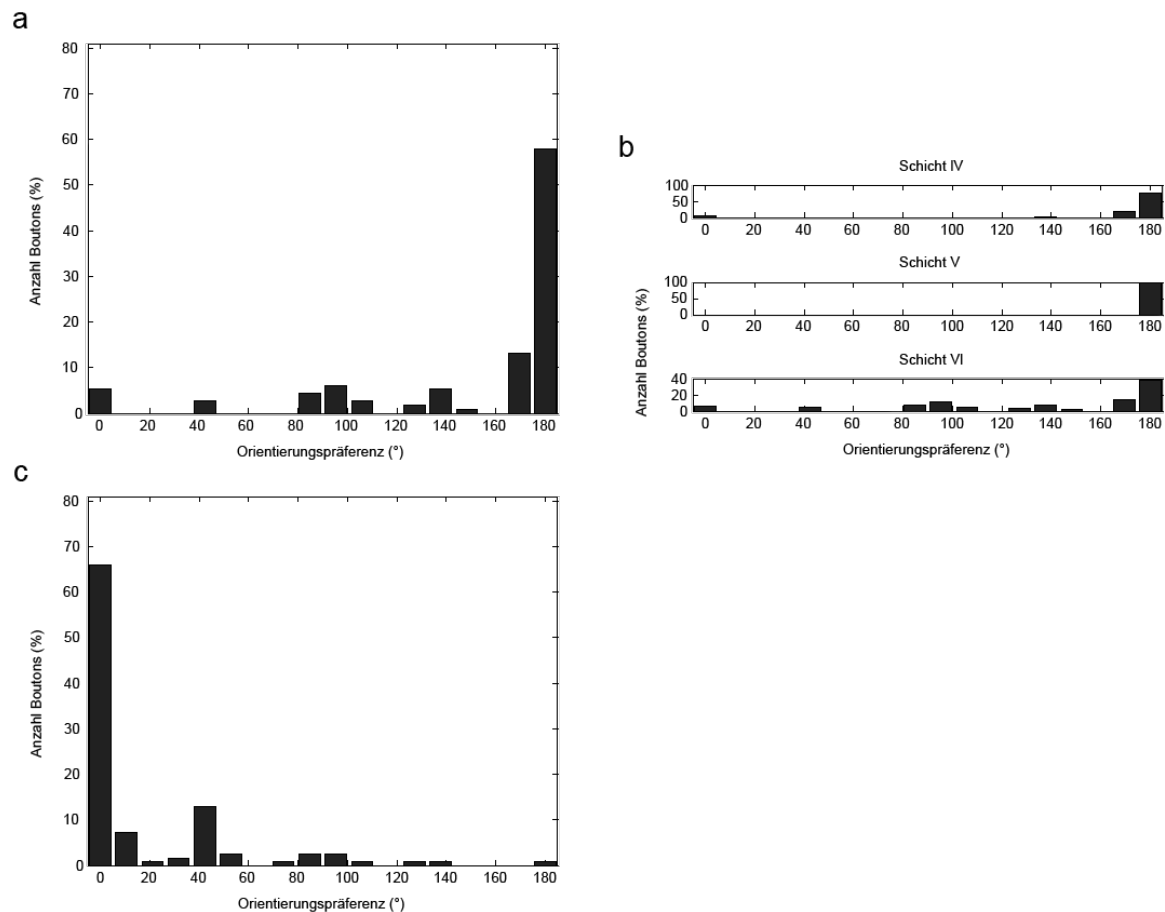
Das Axon 3 bildete ein Terminationsgebiet aus, welches 284 Boutons enthielt, die sich auf die Schichten V und VI verteilten. Der größte Teil dieser Boutons verteilte sich auf die horizontale Orientierung. Bei der Betrachtung der einzelnen Schichten ergab sich für Schicht VI ebenfalls diese klare Zuordnung. Die Boutons aus der Schicht V verteilten sich ebenfalls vorwiegend auf die Orientierung von  $0^\circ$  und  $180^\circ$ , jedoch befand sich eine geringe Anzahl von Boutons in der vertikalen und den diagonalen Orientierungen (Abb. 4.53).



**Abbildung 4.53:** Verteilung der Boutons von Axon 3 auf die jeweiligen Orientierungspräferenzen ( $^\circ$ ). Die Werte  $0^\circ$  und  $180^\circ$  entsprechen dabei dem horizontalen Balkenmuster,  $90^\circ$  entspricht dem vertikalen Balkenmuster und  $45^\circ$  und  $135^\circ$  den diagonalen (obliquen) Balkenmustern. **a)** Verteilung der Boutons des Terminationsfeldes T1 von Axon 3 auf die Orientierungen (n=284). **b)** Aufteilung der dargestellten Ergebnisse aus a) nach der Zugehörigkeit der Boutons zu ihrer kortikalen Schichtung (n(V)=158, n(VI)=126).

Das Axon 4 bildete insgesamt 3 Terminationsgebiete aus. Das Terminationsgebiet T2 musste aufgrund seiner Lage in einem nicht stabilen Bereich der Winkelkarte von der Analyse ausgeschlossen werden. Die verbleibenden Gebiete T1 und T3 enthielten 114 bzw. 123 Boutons. Diese Boutons verteilten sich für das Gebiet T1 auf die Schichten IV (n=35), V (n=16) und VI (n=63). In den Schichten IV und V lagen die Boutons in Bereichen, welche ihre höchste Aktivität bei horizontalen Balkenmustern hatten. Der größte Teil der Boutons in Schicht VI befanden sich ebenfalls in horizontalen Bereichen, es befanden sich aber außerdem Boutons in den Bereichen um  $90^\circ$  und um  $135^\circ$ . Das Terminationsgebiet T3 enthielt nur Boutons in der Schicht VI (n=123), welche vorwiegend im Bereich für horizontale Orientierungen lagen, aber wie bei Terminationsgebiet T1 lagen ebenfalls eine geringe Anzahl von Boutons in den Bereichen um  $45^\circ$  und  $90^\circ$  (Abb. 4.54).

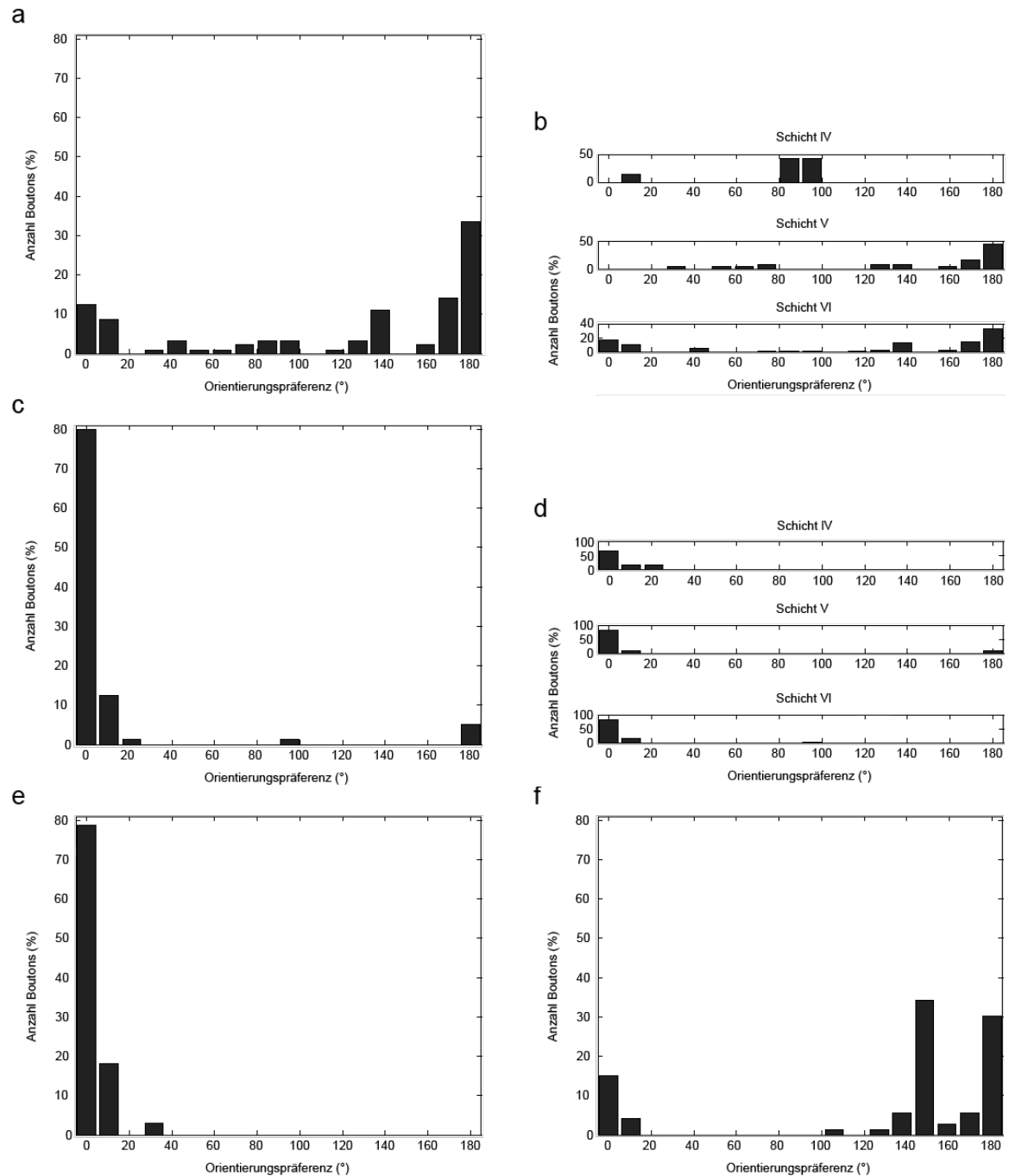
Zusammenfassend kann für Axon 4 gesagt werden, dass es vorwiegend in Bereiche terminierte, welche auf horizontale Stimulation reagierten. Eine geringe Anzahl der Boutons von Axon 4 lagen in Bereichen, die auf vertikale und diagonale Stimulationen reagierten.



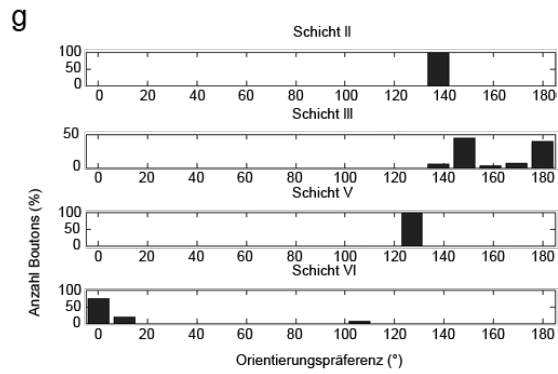
**Abbildung 4.54:** Verteilung der Boutons von Axon 4 auf die jeweiligen Orientierungspräferenzen (°). **a**) Verteilung der Boutons des Terminationsfeldes T1 von Axon 4 auf die Orientierungen (n=114). **b**) Aufteilung der dargestellten Ergebnisse aus a) nach der Zugehörigkeit der Boutons zu ihrer kortikalen Schichtung (n(IV)=35, n(V)=16, n(VI)=63). **c**) Terminationsfeld T3 von Axon 4 (n(VI)=123). Das Terminationsgebiet T2 von Axon 4 wurde aufgrund seiner Lage in Gewebe, einem Bereich, der keine spezifische Orientierungspräferenz zeigte, von der Analyse ausgeschlossen.

Das Axon 5 bildete 4 Terminationsgebiete aus, die sich morphologisch, in der Anzahl und Verteilung der Boutons sowie in ihrer bevorzugten Orientierungspräferenz leicht unterschieden. Das Gebiet T1 enthielt insgesamt 130 Boutons in den Schichten IV (n=7), V (n=25) und VI (n=98). In Schicht IV lagen die Boutons um 90°, in Schicht V und VI vorwiegend um 180° mit wenigen Boutons in den diagonalen Orientierungen. Zusammengefasst ergab sich für das Gebiet T1 eine Verteilung der Boutons über alle Orientierungen mit einer bevorzugten horizontalen Orientierung. Die Terminationsgebiete T2 und T3 enthielten 35 und 82 Boutons in den Schichten IV bis VI. In beiden Gebieten lag der größte Teil der Boutons in Bereichen der Winkelkarte für horizontale Orientierungen. Das Terminationsgebiet T4 enthielt 75 Boutons, die sich über die Schichten II (n=1), III (n=56), V (n=2) und VI (n=16) verteilten. Die Boutons befanden sich in Bereichen, die die Orientierung um 150° und 180° bevorzugten (Abb. 4.55).

Für Axon 5 zeigte sich eine klare Termination in Bereiche, die auf horizontalen Stimuli reagierten nur in den Terminationsgebieten T2 und T3. In den Gebieten T1 und T4 zeigten sich neben den Terminationen in horizontale Bereiche, ebenfalls Terminationen in diagonale Bereiche und für T1 im Bereich um 90 °.



**Abbildung 4.55**



**Abbildung 4.55:** Verteilung der Boutons von Axon 5 auf die jeweiligen Orientierungspräferenzen (°). **a)** Verteilung der Boutons des Terminationsfeldes T1 von Axon 5 ( $n=130$ ). **b)** Aufteilung der Ergebnisse aus a) nach der Zugehörigkeit der Boutons zu ihrer kortikalen Schichtung ( $n(\text{IV})=7$ ,  $n(\text{V})=25$ ,  $n(\text{VI})=98$ ). **c)** Terminationsfeld T2 von Axon 5 ( $n=82$ ). **d)** Aufteilung der Boutons aus T2 nach ihrer kortikalen Schicht ( $n(\text{IV})=6$ ,  $n(\text{V})=43$ ,  $n(\text{VI})=33$ ). **e)** Terminationsfeld T3 von Axon 5 ( $n(\text{VI})=35$ ). **f)** Terminationsfeld T4 von Axon 5 ( $n=75$ ). **g)** Aufteilung der Boutons von T4 zu ihrer kortikalen Schichtung ( $n(\text{II})=1$ ,  $n(\text{III})=56$ ,  $n(\text{V})=2$ ,  $n(\text{VI})=16$ ).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 METHODOLOGISCHE ÜBERLEGUNGEN

Die Verwendung von Dextranaminen als anatomische Tracer wurde in vielen Studien mit guten Erfolgen bewiesen (Kap. 3.2.4.1). Dennoch sind ein paar technische Probleme zu beachten. So führten langsame oder iontophoretische Tracerinjektionen in Versuchen von Rajakumar nur zu einer geringen Gewebeverletzung und somit zu einer geringen Aufnahme in verletzte Fasern in der grauen Substanz (Rajakumar et al., 1993). Diese Injektionsarten waren daher für die hier beabsichtigten Rekonstruktionen wenig geeignet. Bei der verwendeten Druckinjektion musste ausgeschlossen werden, dass es nicht zur Verletzung der weißen Substanz in der Umgebung der Injektionsstelle kam. Dadurch hätte es zu falschen Verbindungsmustern kommen können (Nance and Burns, 1990).

Der bidirektionale Transport in antero- und retrograder Richtung stellt bei Teilrekonstruktionen von Axonen ein großes Problem dar. Die Möglichkeit eines Transportes des Tracers erst in anterograder und anschließenden in retrograder Richtung ermöglicht zwar die Betrachtung von komplexen kortikalen Netzwerken (Smith et al., 1998, Lei et al., 2004, Raju and Smith, 2006), die genaue Bestimmung der Herkunft einer gefundenen Projektion kann dann aber nur mit Schwierigkeiten vorgenommen werden, oder gar nicht, wenn die Darstellung der Ursprungszelle fehlt. Eine vorhandene Färbung in den Zielarealen könnte auch über Kollateralen von weit entfernten markierten Zellen entstanden sein (Chen and Aston-Jones, 1998). Eine Markierung nur von Kollateralen und nicht des Zellkörpers nach einer erfolgreichen Injektion kann generell für BDA nicht komplett ausgeschlossen werden. Zu Beginn dieser Studie wurde eine Vielzahl von Rekonstruktionen in Schicht I von Area 18 begonnen. Diese Projektionen wurden nach Teilrekonstruktionen in der Literatur als Axonterminalien von im MT liegenden Neuronen beschrieben (Rockland and Knutson, 2000). Das Areal MT ist das homologe Areal zu PMLS beim Primaten. In ihrem Verlauf führten die hier angefertigten Rekonstruktionen jedoch immer zu einem Zellkörper in Area 18 und konnten somit als Axonkollateralen dieser Neurone zugeordnet werden. Diese Projektionen wurden über die Aufnahme des Tracers in die Axone in PMLS und den weiteren retrograden Transport zum Zellkörper in Area 18 hervorgerufen. Für die rekonstruierten Axone konnte diese Art der Markierung über Kollateralen/Axone jedoch ausgeschlossen werden, da in den meisten Fällen der Zellkörper in PMLS gefunden wurde. Wenn dies nicht der Fall war, konnte weiterhin in der gesamten Rekonstruktion auch kein Zellkörper gefunden werden. Die gefundenen Zellkörper und die rekonstruierten Axone deuten darauf hin, dass es sich um extrinsische exzitatorische Verbindungen handelt. Wenn das Ursprungsneuron gefunden wurde, handelte es sich um Pyramidenzellen, die die einzigen bedornten Zellen in PMLS

sind (Lowenstein and Somogyi, 1991). Ergänzend haben nur exzitatorische Neurone „en passant“-Boutons, die auf den rekonstruierten Axonterminalien gefunden wurden (Kisvarday et al., 1997, Anderson et al., 2002). Das Vorkommen von inhibitorischen Neuronen, konnte in der vorliegenden Studie nicht untersucht werden. Inhibitorische Neurone bilden im Vergleich zu exzitatorischen Neuronen axosomatische symmetrische Synapsen aus, die über eine zusätzliche Markierung mittels entsprechenden Antikörpern lichtmikroskopisch hätten sichtbar gemacht werden müssen (Farinas and DeFelipe, 1991). Inhibitorische kortikokortikale Feedback-Projektionen konnte ebenfalls bisher nur zwischen den visuellen Arealen 18b und 17 im Kortex der Ratte gezeigt werden (McDonald and Burkhalter, 1993). Ob solche Verbindungen ebenfalls bei der Katze vorkommen und ob sie sich auf benachbarte Areale beschränken ist bislang ungeklärt.

Ein weiterer Aspekt, der hier diskutiert werden muss, ist die Überlagerung (Alignment) zwischen den rekonstruierten Axonen und den funktionellen Karten. Es gibt zwei Möglichkeiten, dieses Alignment durchzuführen: die erste Methode verwendet das aufgenommene Blutgefäßbild und bringt dieses mit den gezeichneten oberflächlich liegenden Blutgefäßen in der Geweberekonstruktion zur Deckung (Karube and Kisvarday, 2011). Dabei kann die funktionelle Karte anhand einer Vielzahl von Blutgefäßen an die äußere Kontur der Rekonstruktion angepasst werden. Durch dieses Alignment ist es aber nicht möglich auf vorkommende Gewebeunterschiede wie z.B. eine veränderte Gewebeschrumpfungen zu berücksichtigen. Die zweite Methode verwendet für das Alignment Referenzelektroden, die senkrecht zur Kortexoberfläche in das Gewebe eingeführt werden (Fukuda et al., 2006). Diese Markierungen werden in das Blutgefäßbild und in die funktionellen Karten übertragen. Durch das Vorhandensein der Markierungen in unter der Oberfläche liegenden Schichten können somit lokale veränderte Schrumpfungen der Gewebeschnitte ausglich werden. Für jeden Gewebeschnitt in der Rekonstruktion konnte somit die Schrumpfung des Gewebes anhand der vorhandenen Referenzpunkte genau berechnet werden. In der hier vorliegenden Rekonstruktion waren die durch die Elektroden zugefügten kreisrunden Verletzungen bis zu einer Schnitttiefe von 4800 µm vorhanden und konnten so gut auch für Projektionen in tieferen Bereichen des Gewebes benutzt werden.

## 5.2 ANATOMIE VON FEEDBACK-PROJEKTIONEN

Untersuchungen der Komplexität von kortikalen Verschaltungen brachten anfänglich Vorstellungen hervor, die davon ausgingen, dass die Verbindungen von einzelnen Neuronen miteinander keine Aussagekraft hätten, erst eine große Anzahl von gerichteten Verbindungen würde ein Netzwerk hinreichend beschreiben (Sholl, 1956). Nachfolgende Studien z. B. von Hubel und Wiesel (Hubel and Wiesel, 1962) kamen zu dem Schluss, dass durch das Vorhandensein von sehr spezifischen und stereotypen Verbindungen eine kristallartige kortikale Architektur entstand (Szentagothai, 1975), die später als Kolumnen

bezeichnet wurden. Durch die Entwicklung von neuen Farbstoffen, Untersuchungsmethoden und neuen mathematischen Modellen wurde es möglich, genauere Verbindungsdarstellungen zu generieren. Die durchgeführten Untersuchungen der Feedback-Verbindungen zwischen dem posteromedialen Teil des lateralen suprasylvischen Areals und dem primären visuellen Kortex der Katze konnten die vorhandene Lücke in der Literatur füllen.

Wie genau sich die gefundenen Projektionen und Verbindungsmuster in die bekannten Vorstellungen einer hierarchischen Organisation und in die modulare Verarbeitungsstruktur des primären visuellen Kortex einfügen, soll erörtert werden.

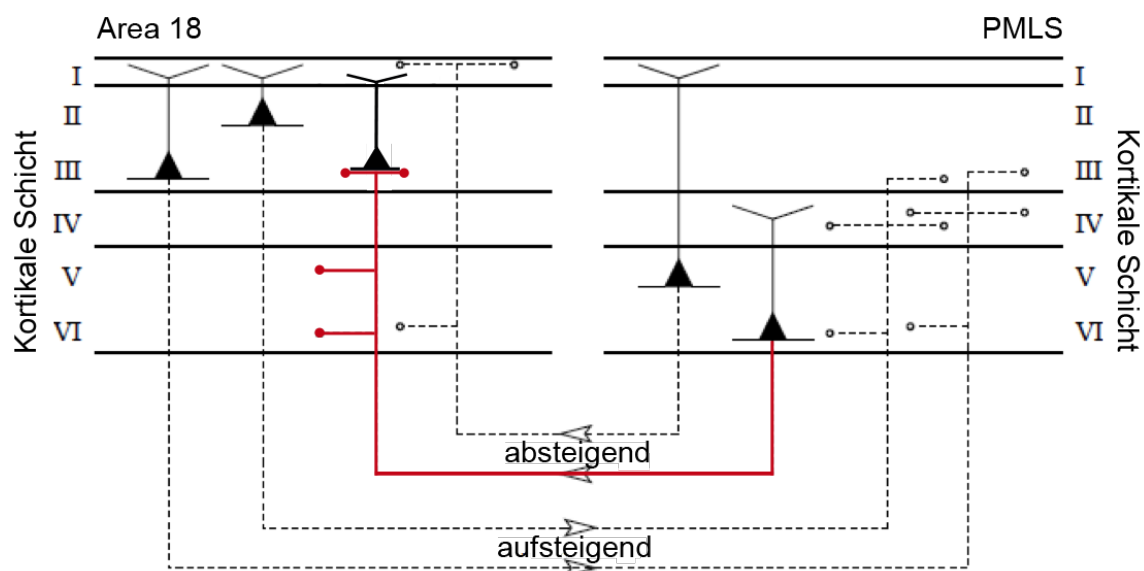
### 5.2.1 GLOBALE PROJEKTIONEN VON PMLS UND REZIPROZITÄT

Nach den Injektionen in den posteromedialen Teil des lateralen suprasylvischen Areals zeigten sich Verbindungen zu den visuellen Arealen 17, 18, 19, 21a, 7, AMLS, ALLS und PLLS. In der Literatur wurden diese Verbindungen und zusätzlich mit den Arealen 21b und 20a beschrieben (Symonds and Rosenquist, 1984). Projektionen zu Area 7 und ALLS wurden bisher noch nicht beschrieben.

Die Unterschiede in den Projektionsmustern zwischen den Arealen lassen sich durch folgende Punkte erklären. Die Areale 21b und 20a befinden sehr weit ventral im Kortex (Abb. 2.2) und liegen somit nicht mehr innerhalb der angefertigten Schnittserien, die für die Rekonstruktionen untersucht wurden. Ein Vorhandensein dieser Verbindungen kann daher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Das Vorkommen von Verbindungen mit ALLS und Area 7 ist auf die Verwendung von Dextranaminen zurückzuführen. Mit diesem Tracer ist es möglich, auch sehr schwache und filigrane Verbindungen sichtbar zu machen. Das Vorkommen dieser Verbindungen wird durch eine ausführliche Studie von Grant und Hilgetag (2005) unterstützt, die Verbindungen zu allen benannten Arealen aufzeigen konnte.

Die Reziprozität der Verbindungen zwischen kortikalen Arealen gilt als allgemein gesichert (Symonds and Rosenquist, 1984, Buhl and Singer, 1989). Auf der Ebene der rekonstruierten Axone ist ersichtlich, dass sich in den Terminationsbereichen der Axone stellenweise auch retrograd markierte Neurone befinden. Es wurde eine direkte Verbindung von einem Feedback-Neuron zu einem Feedforward-Neuron gefunden. Das rekonstruierte Axon 1 bildet in seinem Terminationsfeld T2 Verzweigungsäste in Area 18 aus, die stellenweise im direkten Umfeld eines retrograd markierten Neurons lagen und ein direkter Kontakt über Boutons mit dem Zellkörper in Schicht III als sicher erscheinen lassen (Abb. 4.14). Bei der Betrachtung dieser Schleife in Verbindung mit den generellen Projektionsprinzipien von Feedforward-Verbindungen ist ersichtlich, dass direkte Verbindungen nur wie im gefundenen Fall mit Neuronen aus den supragranulären Schichten vorkommen können (Abb. 2.4). Dieses reziproke Verhalten von Verbindungen mit direktem

Kontakt konnte bisher nur in einer weiteren Studie im visuellen Kortex der Ratte gezeigt werden, in der die Verbindungen zwischen dem primären visuellen Kortex und dem zweiten latero-medialen Areals untersucht wurden. Dabei zeigten Feedback-Terminationen in Schicht I eine direkte Verbindung zu Dendriten von feedforward projizierenden Neuronen (Johnson and Burkhalter, 1996, Shao and Burkhalter, 1999). Eine direkte Verbindung zwischen den Terminalien von einem Feedback-Neurons und dem Zellkörper eines Feedforward-Neurons in Area 18 in den supragranulären Schichten konnte hier also erstmals gezeigt werden (Abb. 4.14 und 5.1). Um das Vorkommen von direkten Verbindungen zu sicher, sind zusätzliche Untersuchungen der Terminationsbereiche in Verbindung mit einer Analyse des Verteilungsmusters der retrograd markierten Neurone in Area 18 nötig.



**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung der laminaren Organisation von Feedback- und Feedforward-Verbindungen zwischen PMLS und Area 18 und einer Feedback-Schleife (rot) (modifiziert nach Spratling, 2002).

### 5.2.2 FEEDBACK-PROJEKTIONEN VON NEURONEN IN PMLS

In der vorliegenden Studie wurden insbesondere Feedback-Projektionen untersucht, die in den zentralen Gesichtsfeldrepräsentationen von Area 18 terminieren.

Die Zellkörper dieser Projektionsneurone verteilten sich, sowohl auf die infragranulären und als auch auf die supragranulären Schichten (70 bzw. 29%); nur 1% der Neurone befanden sich in Schicht IV. Diese Verteilung der Neurone fügt sich in die beschriebenen Muster der Feedback-Verbindungen sehr gut ein und man kann trotz der ungleichmäßigen Verteilung der Neurone zwischen den infra- und supragranulären Schichten noch von einem bilaminaren Ursprung der Feedback-Projektionen zu Area 18 sprechen (Felleman and Van Essen, 1991).



Die räumliche Verteilung der Neurone zeigte eine breite Streuung der Neurone über die komplette Ausdehnung von PMLS in den Schichten V und VI. In beiden untersuchten Gehirnen wurde in a-p-Richtung eine besonders hohe Dichte an Projektionsneuronen in der Mitte des Areals sichtbar, welche sich in einer Breite von ~2,1 mm bzw. ~1,4 mm über alle Schichten erstreckte. Die Streuung des Neurone über das ganze Areal deutet auf eine ausgeprägte Divergenz in der Informationsverarbeitung zwischen Area 18 und PMLS hin. Die innerhalb der Injektionsstellen verarbeiteten visuellen Informationen werden im hierarchisch höheren Areal PMLS über seine komplette Ausdehnung weiterverarbeitet. Somit kann hier eine allgemeine globale Integration der eintreffenden Informationen stattfinden. Bei der Konzentration der Neurone im mittleren Bereich des Areals und seine Ausdehnung über alle kortikalen Schichten kann es sich um den retinotopen Bereich des kontralateralen visuellen Gesichtsfeldes handeln. Einzelzell- und Multiunit-Ableitungen der Areale auf dem lateralen suprasylvischen Sulcus zeigten, dass alle Areale, inklusive PMLS, das kontralaterale Gesichtsfeld repräsentieren. Zentrale visuelle Bereiche werden dabei stärker repräsentiert als periphere Bereiche (Spear and Baumann, 1975, Palmer et al., 1978, Tusa et al., 1979). Bei der Betrachtung der Verteilung der selektiv markierten Neuronen in PMLS lässt sich in den räumlichen Projektionen (Abb. 4.8 und Abb. 4.9, jeweils Bild 2 und 3) ein leichter seitlicher Versatz der einzelnen Populationen (Markierung entweder mit Fluorescein oder mit Tetramethylrhodamin) zueinander in a-p-Richtung über alle beteiligten Schichten erkennen. Dieser Versatz erklärt sich über die vorherrschende Retinotopie im betrachteten Areal. Die Injektionsstellen lagen dabei zwar räumlich getrennt in Area 18, aber über die großen rezeptiven Felder in PMLS wurden diese Bereiche überlappend in PMLS verarbeitet.

Teilweise zeigte sich innerhalb der Ursprungsneurone der Feedback-Projektionen auch einen topographische diskrete kolumnäre Struktur (Abb. 4.16). Dies ließ sich allerdings nicht durchgängig nachweisen. Nichtsdestotrotz erscheint diese als ein interessanter Hinweis zur funktionellen Struktur der Feedback-Verbindungen, der nachfolgend noch weiter diskutiert werden soll.

### 5.2.3 MORPHOLOGIE UND MORPHOMETRIE DER FEEDBACK-VERBINDUNGEN

Anhand der Schnittserien, die aus den Versuchen mit Injektionen in PMLS angefertigt wurden, konnten insgesamt 5 komplette Axonbäume rekonstruiert werden. Die Axone entsprangen innerhalb der zwei Schnittserien in unterschiedlichen Bereichen von PMLS (Abb. 4.47 und Abb. 4.50), standen aber alle über intrinsische Verbindungen mit der Injektionsstelle in Verbindung. Die rekonstruierten Axone unterschieden sich hinsichtlich quantitativ morphologischer Parameter erheblich voneinander. Die Gesamtlängen lagen zwischen 14575 und 76832  $\mu\text{m}$ , die Anzahl an Knotenpunkte lag zwischen 2 und 96 und die Axone enthielten 281 bis 4878 Boutons (Kap. 8.7.4). Die große morphologische Variabilität im Feedback-System wurde auch schon in anderen Studien beschrieben, jedoch sind kaum

Informationen über die Feinstruktur der Terminationen, die laminare Verteilung sowie die funktionellen Eigenschaften der Terminationsgebiete vorhanden (Ungerleider and Desimone, 1986, Shipp and Zeki, 1989b, a).

In der vorliegenden Studie konnten solche ergänzenden Informationen über die einzelnen Terminationsfelder von Feedback-Axonen ermittelt werden. Anhand der Lage dieser Felder konnten die Axone in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe bildete nur Terminationen in Area 18 aus und die zweite Gruppe bildete Terminationen in Area 17 und Area 18 aus. Aus früheren veröffentlichten Untersuchungen geht hervor, dass nach Injektionen im MT beim Makaken mehrere der markierten Axone in V1 und V2 terminierten, wobei die Terminationsfelder in V1 größer waren als in V2. Ebenfalls konnte nach Injektionen von fluoreszierenden Farbstoffen in V1 und V2 gezeigt werden, dass 10% der Neurone in MT/V5 mit beiden Farbstoffen markiert wurden (Kennedy and Bullier, 1985, Rockland and Knutson, 2000). Bei den beiden Axonen (A2 und A4), die in dieser Studie jeweils Terminationsfelder in Area 17 und in Area 18 ausbildeten, fielen die Terminationsfelder in Area 17 geringfügig größer im Volumen aus, waren aber erheblich länger in ihrer Gesamtlänge als die Terminationsfelder in Area 18. Diese Unterschiede in den Terminationsgebieten eines Axons wurden von Rockland bei der Betrachtung der Verbindungen der Areale V4 mit V1 und V2 ebenfalls beschrieben. Sie entwickelte daraus eine sogenannte "Distanzregel" (distance rule), nach der die Terminationsfelder umso größer ausfallen, je weiter die verbundenen Areale hierarchische voneinander entfernt sind. Die Terminationsfelder von V4 im Makaken, fielen dabei in V1 größer aus als in V2, da V1 weiter von V4 entfernt liegt als V2 (Rockland et al., 1994). Ein weiterer Unterschied zwischen den Terminationen in Area 17 und Area 18 ließ sich bei der Betrachtung der Boutondichten feststellen. In Area 17 waren die Boutondichten niedriger als in den Feldern in Area 18.

Die morphologischen Merkmale aller rekonstruierten Axone ließen eine Einteilung der Terminationsfelder in zwei morphologisch unterschiedliche Gruppen zu. Die erste Gruppe bildete Terminationsfelder, die sich in der Zielregion mehrfach in kurzen Abständen verzweigten und dann aus mehreren parallel verlaufenden Zweigen bestanden. Diese parallelen Zweige deckten somit einen langgezogen Gewebebereich in einer konstanten Breite ab. Die zweite Gruppe bildete Terminationsfelder, die sich vom Hauptast abzweigten, von den anderen Terminationsfeldern separiert waren und sich fächerförmig aufspalteten. So wurde ein größeres Gewebevolumen innerviert. Diese zwei nebeneinander vorkommenden Arten von Terminationsfeldern wurden auch bei anderen Feedback-Projektionen gefunden und beschrieben (für V2 (Rockland and Virga, 1989) und für V4/TEO (Rockland et al., 1994)). Diese Anordnungen der Terminationsgebiete unterscheiden sich erheblich von Feedforward-Projektionen. Letztere bilden Terminationsfelder aus, die sich balkenförmig ins Gewebe erstrecken und räumlich klar voneinander getrennt sind.

Die Terminationsgebiete der hier rekonstruierten Axone befanden sich entweder in infra- und supragranulären Schichten oder komplett in einzelnen infragranulären Schichten. Die laminare Verteilung der Terminationen von Feedback-Projektionen ist von der Repräsentation des Gesichtsfeldes in der Zielregion abhängig. Projektionen, die in periphere Bereiche des Gesichtsfeldes ziehen, terminieren in den Schichten I, IV und VI. Projektionen, die in zentrale Bereiche ziehen, beschränken sich zeigen auf die Schichten IV und VI (Maunsell and van Essen, 1983, Ungerleider and Desimone, 1986). Die Projektionen in der vorliegenden Studie zeigten ebenfalls keinerlei Terminationen in Schicht I, was sich gut mit der zentralen Gesichtsfeldrepräsentation erklären lässt, in der die Tracer-Injektionen vorgenommen worden sind.

Feedback-Verbindungen sind im Allgemeinen deutlich divergenter als Feedforward-Verbindungen und erstrecken sich über größere Volumina in den Zielregionen. Die hohe Variabilität in den Terminationsmustern (verschiedene Schichten in einem Axon) konnten bisher nur in einer Studie für die Verbindung von MT zu V1 gezeigt werden (Rockland and Knutson, 2000). Untersuchungen bei Makaken zwischen den Arealen TE und TEO zeigten ebenfalls eine unterschiedliche Verteilung der Terminationen, d.h. die Komplexität könnte ein Merkmal von in der Verarbeitungshierarchie höher gelegenen Areale sein (Suzuki et al., 2000). Weitere Untersuchungen mit größeren Stichproben in anderen Feedback-Systemen sind allerdings nötig, um diese These weiter zu untermauern. Die hohe Divergenz der Feedback-Verbindungen kann ebenfalls mit den antagonistischen center-surround Effekten der rezeptiven Felder korrelieren. Dabei kann das Feedback die Antwortstärke des Centers erhöhen und die unterdrückenden Einflüsse des Umfeldes inhibieren. Diese Effekte konnten in Deaktivierungsstudien von MT beim Makaken bei Neuronen in V1 gezeigt werden (Hupe et al., 1998). Ergänzend kann aus der Divergenz der Terminationsfelder ein zeitlicher Faktor entstehen, der bei weiteren Verarbeitungsprozessen wichtig sein kann. Durch die unterschiedlichen Entfernungen von den Ursprungsneuronen zu ihren Terminationsfeldern und den unterschiedlichen Gesamtlängen der einzelnen Terminationsfeldern kann es zu voneinander abweichenden Laufzeiten bei der Signalübertragung kommen. Die zeitlichen Einflüsse der Feedback-Projektionen modulieren neueintreffende Signale in Area 17 und Area 18 so im weiteren Verlauf der Signalverarbeitung.

Hinsichtlich der Boutonverteilung auf den Axonen ließen sich ebenfalls große Unterschiede zwischen den rekonstruierten Axonen finden: die Anzahl der Boutons lag zwischen 281 bis 4878 auf einer kompletten Länge der Axone von 14575 bis 76832  $\mu\text{m}$ . Die Dichte lag zwischen 9 und 63 Boutons pro mm. In den rekonstruierten Axonen aus dem visuellen Kortex der Katze zeigte sich aber eine Konzentration der Boutons an den distalen Segmenten. In einer vergleichbaren Studie von Rockland und Knutson zeigte sich eine ebenfalls hohe Variabilität in der Boutonanzahl auf insgesamt 11 rekonstruierten Axonen. Es

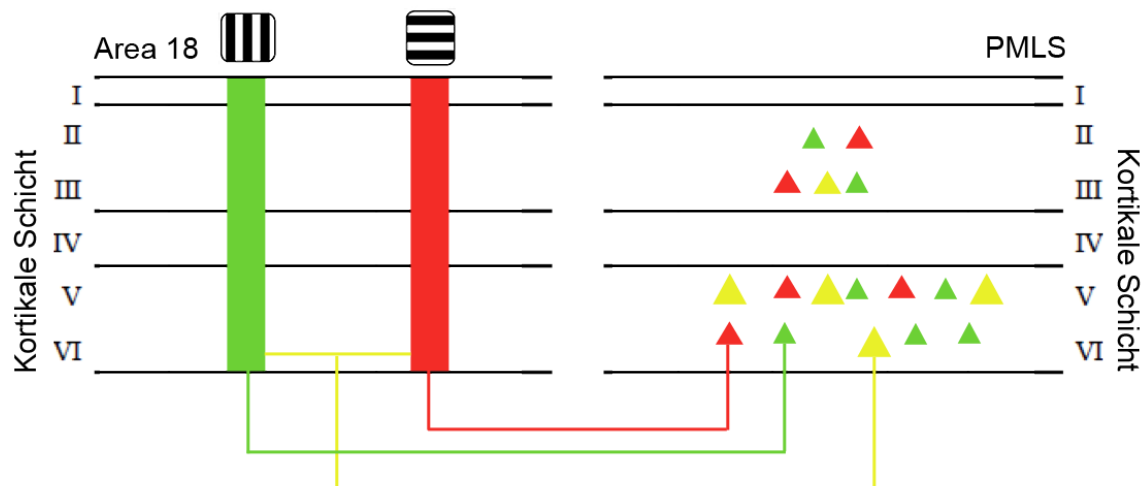
wurden neben geringen Vorkommen von 221, 395 oder 453 Boutons auch sehr hohe Vorkommen von bis zu 2139 Boutons gefunden (Rockland and Knutson, 2000). Weitere Studien, die Boutonverteilungen von projizierenden Neuronen analysieren sind bisher nicht vorhanden. Bei der Betrachtung von Analysen, die sich mit der Boutonverteilung von intrinsischen Axonen beschäftigen, finden sich Ansatzpunkte, die auch für die Feedback-Projektionen herangezogen werden könnten. Die Anzahl und die Dichte der Boutons eines intrinsischen Axons sind abhängig von seiner Lage im Kortex und vom Typus seines Ursprungsneurons. Eine unterschiedliche Anzahl von Boutons spricht daher für verschiedene Zelltypen, ist aber auch bei Zellen des gleichen Typs abhängig von der Schichtzugehörigkeit. So kann eine Pyramidenzelle aus Schicht II/III 2000 Boutons ausbilden und eine aus Schicht V 3000 Boutons. Und je länger das Axon einer Zelle ist, desto mehr Boutons besitzt es. Die Boutons werden vorwiegend auf den distalen Segmenten der Axonbäume ausgebildet, andere Segmente weisen nur selten eine regelmäßige Verteilung auf (Anderson et al., 2002). Welche genauen Mechanismen die Ausdehnung der axonalen Segmente und die Ausbildung von Boutons bestimmen, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt, sie sind aber abhängig von folgenden Faktoren: Zelltyp des Ursprungsneurons, Lage des Ursprungsneurons, die Lage der axonalen Segmente in der kortikalen Schichtung und der zytoarchitektonischen und funktionellen Organisation der Zielregion. Wie genau die rekonstruierten Axonbäume in das funktionelle Netzwerk der Zielregion eingreifen, soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

### 5.3 FUNKTION DER FEEDBACK-PROJEKTIONEN

Die Untersuchung von physiologischen Einflüssen von Feedback-Verbindungen in Kombination mit Komplettrekonstruktion von axonalen Projektionen ist nur sehr eingeschränkt möglich. Die Auswirkungen des Fehlens des Feedbacks von einem Areal im gesamten Netzwerk bei der Verarbeitung von Stimuli werden z. B. bei Deaktivierungs- oder Läsionsstudien sichtbar. Hierbei werden ganze kortikale Bereiche entweder durch Kühlung reversibel oder durch Läsionen irreversibel deaktiviert. Diese Arten von Untersuchungen lassen eine detaillierte Rekonstruktion von kompletten Projektionssmustern kaum zu, da es zu massiven Veränderungen in der Gewebestruktur kommen kann. Für eine erfolgreiche Rekonstruktion darf das Gewebe nur minimale Verletzungen aufweisen, da jede Verletzung zu einer veränderten Gewebeschrumpfung an der betreffenden Stelle führt und in der Rekonstruktion ausgeglichen werden muss. In der vorliegenden Studie wurde für die Gewinnung der physiologischen Daten die Methode des Optical Imagings gewählt, da diese nur zu sehr geringen Veränderungen des Gewebes führte.

### 5.3.1 FUNKTIONELLE ORGANISATION DER FEEDBACK-PROJEKTIONEN VON NEURONEN IN PMLS

Für die Injektion von Dextran konjugiert mit Fluorescein und Dextran konjugiert mit Tetramethylrhodamin in Area 18 wurden zwei Bereiche in den Differenzkarten gewählt, die für vertikale Stimuli (Fluorescein) und für horizontale Stimuli (Tetramethylrhodamin) sensibel waren (Abb. 3.2). Die gefundenen feedback aussendenden Neurone in PMLS, die ihre Projektionen in die Injektionsbereiche in Area 18 ausschickten, konnten in zwei Gruppen untergliedert werden. Die erste Gruppe bildeten Neurone, die selektiv entweder Fluorescein (62%) oder Tetramethylrhodamin (28%) enthielten, ihre Projektionen also nur in Bereiche der Orientierungskarten aussendeten, die entweder auf vertikale oder horizontale Stimuli reagierten. Die zweite Gruppe bildeten Neurone, die beide Tracer in ihren Zellkörpern in PMLS enthielten (10%) und somit Projektionen in beide funktionellen Bereiche aussendeten. In einer Studie von Spear und Baumann (1975) wurden die Richtungsselektivitäten von Neuronen im lateralen suprasylvischen Sulcus anhand von Einzelzellaufzeichnungen untersucht. Dabei konnten die gefundenen Zellpopulationen in Gruppen aufgeteilt werden: 81% der 213 aufgenommenen Neurone reagierten auf bewegte Stimuli, von denen reagierten 92% auf nur eine Bewegungsrichtung und zeigten eine Inhibition oder keine Reaktion auf Bewegungen in die entgegengesetzte Richtung, während nur 5% der Neurone auf beide Bewegungsrichtungen gleichermaßen reagierten. Somit ist die große Mehrzahl der Neurone in PMLS deutlich richtungsselektiv (Spear and Baumann, 1975). Ein direkter Vergleich der Zellpopulationen bei Betrachtung der Richtungs- und der Orientierungsselektivität ist nur bedingt möglich. In beiden Fällen zeigt sich aber, dass es Zellpopulationen gibt, die auf mehrere Orientierungen oder Bewegungsrichtungen reagieren. In der vorliegenden Studie zeichnete sich diese Zellpopulation also durch eine größere Divergenz aus, die ergänzt durch ihre breite Streuung über die komplette Ausdehnung des Areals für eine globale Integration in der Informationsverarbeitung herangezogen werden kann (Abb. 5.2). Diese unselektiv markierten Zellen, die demnach sehr viele Projektionen in unterschiedliche Orientierungskolumnen in Area 18 ausschicken müssen, hatten einen signifikant größeren Zellkörper, als die gefundenen selektiv markierten Neurone. Diese Vergrößerung des Zellkörpers in Verbindung mit der erhöhten Komplexität der Konnektivität wurde in der Literatur bereits beschrieben (Elston and Rockland, 2002).



**Abbildung 5.2:** Schematische Darstellung der Organisation von feedback-projizierenden Neurone in PMLS. Es zeigen sich zwei Feedback-Systeme, eins mit einer geringeren Divergenz und Spezifität (rot und grün, entsprechen den selektiv markierten Zellpopulationen mit Fluorescein und Tetramethylrhodamin) und das zweite System mit einer höheren Divergenz und entsprechend vergrößerten Zellkörpern (gelb, entspricht der unselektiv markierten Zellpopulation). Der rote und der grüne Balken deutet jeweils die Injektionsstelle in Area 18 an (modifiziert nach Spratling, 2002).

Nachdem die funktionelle Organisation der Neurone in PMLS nach ihrer Divergenz hin betrachtet wurde, soll nun im Weiteren die räumliche Organisation der retrograd markierten Neurone zueinander betrachtet werden. Es wurden erste Anzeichen für eine diskrete kolumnäre Struktur nach BDA-Injektion in PMLS gefunden (Abb. 4.16). Welche Voraussetzungen für eine kolumnäre Struktur in PMLS vorhanden sein müssen und wie die gefundenen Ergebnisse sich einfügen, soll nun geklärt werden.

Die Schwerpunkte der Ursprungsgebiete der durch die verschiedenen Injektionen dargestellten Feedback-Verbindungen zeigten jeweils einen leichten Versatz zueinander (Abb. 4.8 und 4.9). Dies ließ sich gut anhand der Retinotopie und Größe der rezeptiven Felder in PMLS erklären. Die Bereiche in PMLS, die sich durch die höhere Neuronendichte auszeichneten und sich über alle Schichten erstreckten, besaßen eine Breite von ~2,1 mm bzw. ~1,4 mm. Bei diesen Werten handelte es sich um die maximale Breite bei der Projektion aller räumlich angeordneten Neurone in einer Ebene. Die reellen Breiten oder Durchmesser dieser zwei jeweils überlappenden Bereiche lagen daher unter den angegebenen Werten. Die Größe einer Orientierungskolumne im primären visuellen Kortex ist meist nicht größer als 400 bis 600 µm im Durchmesser und intrakortikale Patches besitzen eine Größe von 200 bis 1000 µm (Kisvarday et al., 1997). Im Vergleich zu diesen

Angaben, lagen die gemessenen Ausdehnungen der zwei Neuronenpopulationen in PMLS in der vorliegenden Studie im Größenbereich einer Orientierungskolumne.

Wie bereits erwähnt, verteilten sich in den Bereichen in PMLS, die eine höhere Neuronendichte aufwiesen, die Neuronpopulationen über alle Schichten. Ob sich eine Orientierungskolumne in PMLS über alle kortikalen Schichten erstreckt, ist ungeklärt. Über elektrophysiologische Messungen konnte die Organisation von Neuronen in MT von *Macaca fascicularis* in Kolumnen nachgewiesen werden, die Neurone mit ähnlichen bevorzugten Orientierungen und Bewegungsrichtungen enthielten. Ob sich diese Kolumnen über alle kortikalen Schichten zogen, konnte mit Einzelzelleableitungen ebenfalls nicht nachgewiesen werden, wurde aber nach dem „Eiswürfel“-Modell von Hubel und Wiesel angenommen (Hubel and Wiesel, 1974, Albright, 1984, Albright et al., 1984). Eine weitere Studie, die sich mit der Organisation von richtungsselektiven Neuronen in MT bei *Cebus apella* beschäftigte, konnte ebenfalls diese kolumnäre Organisation zeigen. Es zeigte sich aber zusätzlich, dass sich die Richtungspräferenz nicht über die gesamte Kolumne erstreckt, sondern dass immer wieder Bereiche innerhalb der Kolumne vorkamen, die graduell ihre bevorzugte Bewegungsrichtung änderten (Diogo et al., 2003). Diese Eigenschaft wird auf die exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge auf richtungsselektive Neurone zurückgeführt, die an der Entstehung von richtungsabhängigen Grenzen innerhalb der funktionellen Organisation beteiligt sind (Roerig and Kao, 1999).

Das Vorkommen von diskreten kolumnären Strukturen in PMLS nach dortigen Injektionen und die Ansammlung von Neuronen in einem bestimmten Bereich in PMLS nach Injektionen in Area 18 und deren Verteilung über alle kortikalen Schichten lassen die Vermutung zu, dass der PMLS der Katze ähnlich wie bei *Macaca fascicularis* und *Cebus apella* kolumnär organisiert ist.

### 5.3.2 MODULARE INTRINSISCHE VERBINDUNGEN IN PMLS

Die Ursprungsneurone der Axone 3, 4 und 5 befanden sich nicht innerhalb der Injektionsstelle und hatten zueinander einen Abstand von 770  $\mu\text{m}$  bis 4,8 mm (Abb. 4.50). Die Neurone mussten aufgrund der Aufnahme des Tracers intrinsische Verbindungen zur Injektionsstelle haben. Eine Quantifizierung der intrinsischen Verbindungen in PMLS ist in der Literatur bislang nicht vorhanden, aber Untersuchungen mit verschiedenen Farbstoffen im primären visuellen Kortex geben folgende Daten an: in Area 17 der Katze lag die Entfernung zwischen Ansammlungen von Zellen, die durch eine Injektion von WGA-HRP markiert wurden, bei etwa 800  $\mu\text{m}$ . Die Komplexität dieser Ansammlungen oder Patches ist jedoch alters- und erfahrungsabhängig (Luhmann et al., 1986, Callaway and Katz, 1990, Galuske and Singer, 1996). Nach HRP-Injektion in den primären visuellen Kortex zeigten sich intrinsische horizontale Projektionen mit einer Länge von 4-8 mm und die

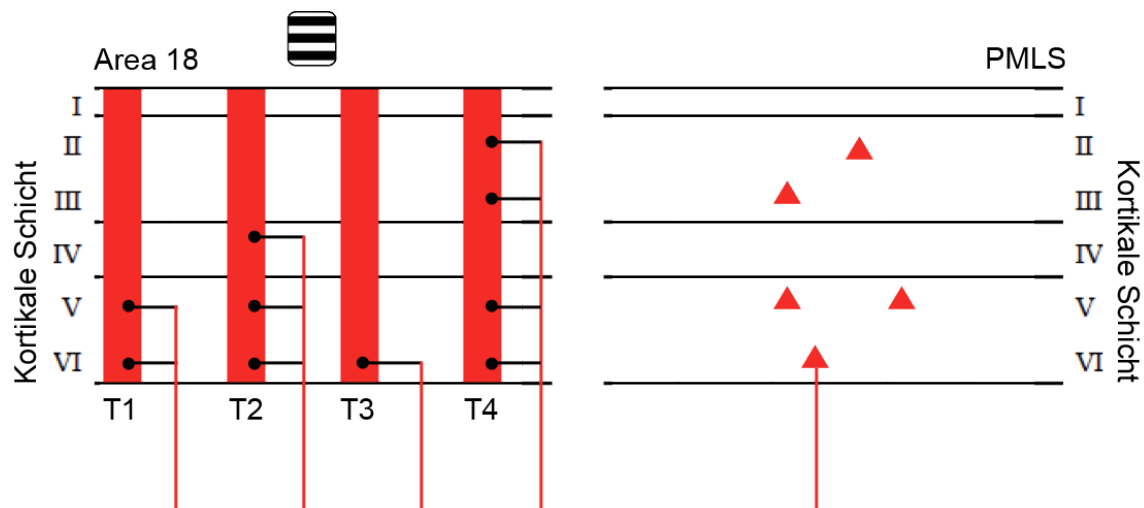
Terminationsfelder eines Axons bildeten Cluster in durchschnittlichen Abstand von 1 mm aus (Rockland and Lund, 1982, Gilbert and Wiesel, 1983). Daher deckten sich die vorliegenden Daten sehr gut mit den Befunden zu intrinsischen Verbindungen in anderen Arealen des Neokortex. Das Vorkommen dieser intrinsischen langreichweitigen Verbindungen in PMLS erlaubt es den Neuronen, die Informationen über große Bereiche des visuellen Feldes zu integrieren, die größer sind als ihre eigenen rezeptiven Felder (Blakemore and Tobin, 1972).

### 5.3.3 KOLUMNÄRE ORGANISATION VON FEEDBACK-TERMINATIONEN

Eine weitere Besonderheit der Feedback-Terminationen von PMLS nach Area 18 war ihre kolumnäre Spezifität. Die Terminationsgebiete der Axone 3, 4 und 5 zeigten mit nur einer Ausnahme eine bevorzugte Termination in Bereichen auf, die bei der Ermittlung der funktionellen Karten auf horizontale Stimulation reagierten. Bisher konnte eine solche funktionelle Spezifität für Feedback-Verbindungen nicht gezeigt werden. Allerdings ist von intrinsischen (Gilbert and Wiesel, 1989, Schmidt et al., 1997a, Schmidt et al., 1997b) und kallosalen Verbindungen (Bosking et al., 1997, Schmidt et al., 1997b, Rochefort et al., 2009) ein an der funktionellen Organisation angelehntes Verbindungsmuster bereits beschrieben worden. In der vorliegenden Studie wird diese Annahme noch weiter dadurch unterstützt, dass Terminationsfelder von verschiedenen Axonen, die mit ihrem Ursprungsneuron mit der Injektionsstelle in Verbindungen stehen, sich im gleichen kortikalen Bereich in Area 18 befanden (Abb. 4.49).

Die Orientierungsspezifitäten wurden in der vorliegenden Studie nach Gebieten und nach den vorhandenen laminaren Verteilungen innerhalb eines Terminationsgebietes untersucht. Diese genaue Aufschlüsselung für jedes Bouton nach Schichtzugehörigkeit wurde durch das durchgeführte Alignment der funktionellen Karte und der Rekonstruktion ermöglicht. Innerhalb der laminaren Verteilung ließ sich die zentrale Tendenz, in Bereichen zu terminieren, die innerhalb der funktionellen Karten auf horizontale Stimulation reagierten, wiederfinden. In wenigen Ausnahmen, wie z.B. bei Axon 5 T1, lagen die Boutons in Bereichen, die auf vertikale Stimuli reagierten (Abb. 4.56b). Die Anzahl der Boutons in Schicht 4 betrug nur 7 und war im Vergleich zu den Boutons in den infragranulären Schichten (123) sehr gering. Die Tatsache, dass ein Axon innerhalb seiner Terminationsfelder in unterschiedlichen Kombinationen von kortikalen Schichten terminieren kann, wurde schon häufiger beschrieben (Rockland, 1989, Rockland and Virga, 1989, Rockland et al., 1999). Sie unterscheiden sich dadurch von den genikulokortikalen Verbindungen, die vornehmlich in den Schichten IV und VI terminieren (Blasdel and Lund, 1983). Aus diesem Unterschied lässt sich schließen, dass kortikale und genikulokortikale Verbindungen unterschiedlich in die kolumnäre Organisation eingreifen. Noch interessanter ist dabei die Tatsache, dass Feedback-Verbindungen in verschiedene Spalten durch ihre unterschiedliche laminare Termination unterschiedlich in die Verarbeitung eingreifen können (Abb. 5.3).





**Abbildung 5.3:** Schematische Darstellung der laminaren Organisation der Feedback-Verbindungen zwischen PMLS und Area 18 am Beispiel von Axon 5. Das Axon besitzt 4 Terminationsfelder, die mit unterschiedlichen laminaren Konfigurationen in die Verarbeitung in Area 18 eingreifen. Die roten Balken in Area 18 entsprechen Bereichen, die eine Orientierungspräferenz für horizontale Stimuli besitzen. Die Terminationen sind vereinfacht durch schwarze Punkte dargestellt (modifiziert nach Spratling, 2002).

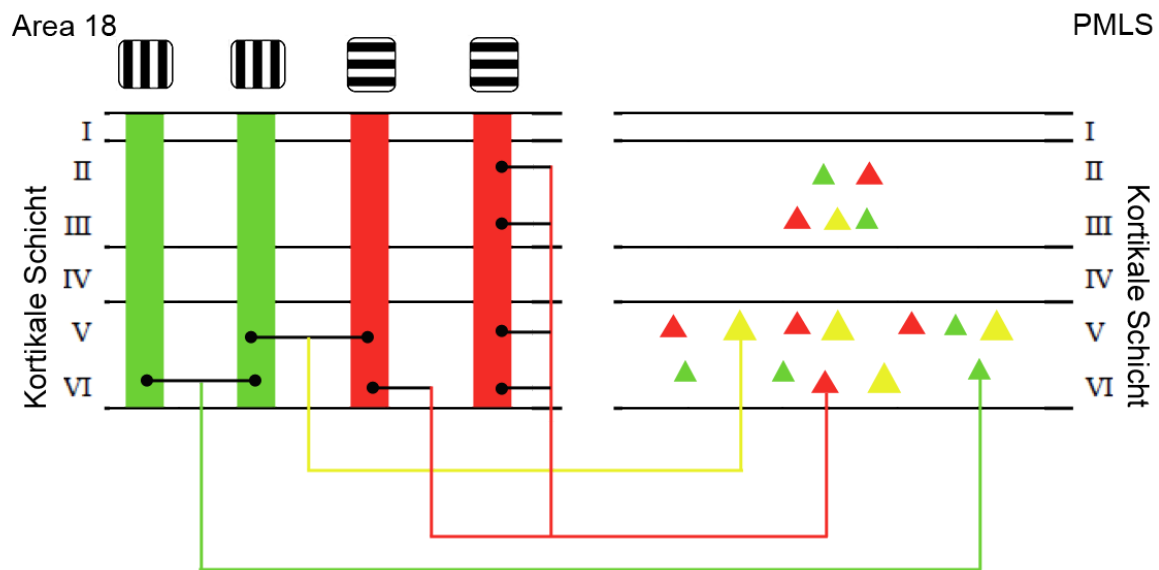
#### 5.4 DIE ROLLE VON FEEDBACK-PROJEKTIONEN VON PMLS ZUM PRIMÄREN VISUELLEN KORTEKX

Durch temporäre thermale Deaktivierung des PMLS konnten über optische und elektrophysiologische Ableitmethoden die funktionellen Auswirkungen des Feedbacks untersucht werden. Der Einfluss des Feedbacks auf die Repräsentation von Orientierungen in Area 18 ist durch eine Erhöhung der neuronalen Aktivität und einer Verbesserung der Antwortselektivität erkennbar. Es hat aber keinen Einfluss auf die generelle Orientierungsselektivität der Neurone und ihrer Organisation innerhalb der funktionellen Karten (Galuske et al., 2002). Die Orientierungsselektivität von Neuronen wird durch die Konzentration von genikulokortikalen Signalen auf Neuronen in Schicht IV (Hubel and Wiesel, 1962, Mignard and Malpeli, 1991, Reid and Alonso, 1996) und über deren Verstärkung innerhalb lokaler Netzwerke hervorgerufen (Eysel et al., 1988, Somers et al., 1998). Da Feedback-Signale selten in Schicht IV terminieren, können sie somit auch nur schwer Einfluss auf die Orientierungsrepräsentation haben. Feedback-Signale treffen eher in infra- und supragranulären Schichten ein. Dort scheinen sie allerdings Einfluss auf die Repräsentation von Bewegungsrichtungen zu haben (Galuske et al., 2002). Die Richtungsselektivität wird nicht über den eben beschriebenen Weg über Schicht IV generiert (Berman et al., 1987, Shmuel and Grinvald, 1996) und die Projektionen von Schicht IV in die supragranulären Schichten tragen nur wenig zur Richtungsselektivität bei (Lee et al., 1998). Es gibt mehrere Faktoren, die die Richtungsselektivität von Neuronen in Area 18 generieren

können: Erhöhung der Antwortstärke auf Bewegung in der bevorzugten Richtung, Aktivierung von weiteren Neuronen oder selektive Inhibition von größtenteils unstrukturierter Aktivität (Crook et al., 1996, Pernberg et al., 1998, Somers et al., 1998).

Auf welchen kortikokortikalen oder kortikogenikularen Verbindungen diese gefundenen Effekte beruhen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, da sowohl direkte und indirekte Feedback-Projektionswege zwischen PMLS und Area 18 vorhanden sind (Payne and Lomber, 2003). Der Einfluss auf die richtungsselektiven Neurone in Area 18 deutet an, dass hier ein sehr präzises direktes Feedback-System vorhanden sein muss. Die rekonstruierten Axone von PMLS nach Area 18 passen aufgrund ihrer kolumnären Organisation in PMLS und ihren Terminationsmustern im primären visuellen Kortex sehr gut zu den beschriebenen physiologischen Effekten bei der Deaktivierung dieser Projektionen. Durch orientierungsspezifische Terminationen von Feedback-Verbindungen könnte die Antwortstärke richtungsselektiver Neurone gezielt moduliert werden. Bei der Untersuchung richtungsselektiver Neurone in Area 17 und 18 mit unterschiedlichen Plaid-Stimuli in Kombination mit optischen Ableitungen und reversibler Deaktivierung des pMS Kortex zeigte sich, dass das Feedback von PMLS sich in den primären visuellen Arealen auf die Unterscheidung von globalen und lokalen Bewegungen auswirkt. Dabei beeinflusst das Feedback die Feuerraten von richtungsselektiven Neuronen unter bestimmten Bedingungen. Nach Deaktivierung des Feedback-Signals aus PMLS zeigte sich eine geringere Verstärkung der Repräsentation von globalen Bewegungen für die Plaid-Stimuli und die Repräsentation von lokalen Bewegungen überwog während der Deaktivierung (Schmidt et al., 2011).

Neben dem sehr spezifischen Feedback-System, welches die Richtungsselektivität beeinflusst, deuteten die Verteilungsmuster der verschiedenen Neuronengruppen nach Injektionen in Area 18 auf ein weiteres System hin. Die Verteilung der Neurone in den infragranulären Schichten über die gesamte Ausdehnung des Areals (Abb. 5.4) ermöglichte aufgrund der vorherrschenden Retinotopie und über die größeren rezeptiven Felder im PMLS als in Area 18 (Dreher et al., 1996b, Villeneuve et al., 2006), eine globale Integration, die z. B. die Erhöhung der neuronalen Aktivität und die Verbesserung der Antwortselektivität zur Folge hätte. Diese Annahme wird unterstützt durch eine Studie in der eine Deaktivierung der oberen Schichten in pMS nur eine schwache unspezifische Abnahme der Antwortstärke der Neurone in Area 17 und 18 bei der Präsentation von Plaid- und Balken-Stimuli zeigte (Schmidt et al., 2011). Nach vollständiger Deaktivierung von pMS zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Verarbeitung der unterschiedlichen Stimuli. Während sich die Aktivitätsmuster nach Präsentation des Balken-Stimulus nicht weiter verringerten, wurden die Aktivitätsmuster der Plaid-Stimuli vollständig aufgehoben.



**Abbildung 5.4:** Schematische Darstellung der laminaren Organisation der Feedback-Verbindungen zwischen PMLS und Area 18 und der Organisation von feedback-projizierenden Neurone in PMLS. Ein globales Feedback entspringt aus den infragranulären Schichten, dort verteilen sich die Neuronpopulationen über die komplette Ausdehnung des Areals und terminieren in unterschiedlichen laminaren Kombinationen in eine oder mehrere Bereiche, die bestimmte Orientierungspräferenzen besitzen. Aus den supragranulären Schichten entspringen die Feedback-Projektionen nur aus einem begrenzten Bereich in PMLS und weisen somit eine geringere Divergenz aus als die Neuronpopulationen in den infragranulären Schichten. Die roten Balken in Area 18 entsprechen Bereichen, die eine Orientierungspräferenz für horizontale Stimuli besitzen und die grünen Balken eine für vertikale Stimuli. Die Terminationen sind vereinfacht durch schwarze Punkte dargestellt (modifiziert nach Spratling, 2002).

## 6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die hierarchische Anordnung der kortikalen Areale im visuellen System wurde auf der Basis von gefundenen Verbindungsstrukturen, ins besonderen der Feedback- und Feedforward-Projektionen hergeleitet. Dabei wurden aber die hohe Komplexität der Terminationsfelder und der laminaren Projektionen auf der Ebene von einzelnen Neuronen sowie die indirekten Verbindungen in kolumnäre Anordnungen nicht bedacht. Ein auffälliges Merkmal der Hierarchie im visuellen Kortex ist das hohe Maß an Parallelverarbeitung in den einzelnen Stufen (s. Kap. 2.2.2). Zwischen und innerhalb den Hierarchiestufen gibt es zahlreiche zusätzliche Übertragungswege, die eine Quervernetzung ermöglichen. Zu diesen Wegen zählen auf intraarealer Ebene die intrinsischen Verbindungen und auf interarealer Ebene die Feedback-Verbindungen (Felleman and Van Essen, 1991). In der vorliegenden Studie gibt es Hinweise darauf, dass die Feedback-Systeme zwischen dem pMS und dem primären visuellen Kortex hoch komplex sind. Die beschriebenen Terminationsmuster sind abhängig von der kolumnären Organisation im pMS und von der funktionellen Organisation, die für die Erkennung von Orientierung und Bewegungsrichtung zuständig ist.

Ein Modell, welches die gefundene selektive Modularität der Terminationen beschreibt ist die prädiktive Kodierung. Sie beschreibt die Verarbeitung von visuellen Informationen, in der die Feedback-Verbindungen von höheren zu niederen visuellen kortikalen Arealen Vorhersagen (engl. prediction) tragen, die durch die neuronale Aktivität der hierarchisch niedrigeren Areale hervorgerufen wird (Rao and Ballard, 1999). Dabei schicken „Vorhersage“-Neurone exzitatorische Projektionen zu sogenannten „Fehlererkennungs“-Neuronen (engl. error-detecting) im nächst höheren Areal und inhibitorische Projektionen zurück zu dieser Art von Neuronen in einem niedrigeren Areal (Friston, 2005). Spratling beschreibt dieses Modell der Verarbeitung so, dass die interregionale Feedforward-Weitergabe die Informationen über Veränderungen („errors“) trägt und die Feedback-Projektionen die Vorhersagen (Spratling, 2008). Bei der Übertragung dieses Modelles auf die gefundene selektive Modularität der Feedback-Projektionen, die alle in ähnlichen Orientierungen im primären visuellen Kortex terminieren, lässt vermuten, dass über dieses Feedback eine Erhöhung der Antwortstärke auf Bewegung in der entsprechenden Richtung erfolgen kann, die zur Ausprägung der Richtungsselektivität führen kann.

Die Einteilung der extrinsischen Projektionen in Feedforward-, Feedback- und laterale Projektionen mit einem bilaminaren Ursprung wurden in einer Studie von Grant und Hilgetag ausführlich untersucht (Grant and Hilgetag, 2005). Sie kamen aufgrund der quantitativen Analyse der Neuronenverteilungen in den supra- und infragranulären Schichten in den Arealen des pMS zu der Erkenntnis, dass sich die Areale PMLS, AMLS und PLLS nicht auf

der gleichen Hierarchiestufe befinden, sondern sich in einer Reihung innerhalb dieser Stufe befinden. PMLS befindet sich dabei auf der untersten Stufe.

Die gefundene Organisation der Neurone in PMLS, die in Abhängigkeit ihrer Terminationen in unterschiedlichen funktionellen Bereichen markiert wurden, deutet an, dass zu der Betrachtung der Hierarchieebenen aufgrund der strukturellen Organisation auch die funktionellen Verbindungsaspekten hinzugefügt werden müssen. So kann man davon ausgehen, dass ein weit komplexeres Netzwerk zur Verarbeitung der visuellen Informationen vorhanden sein muss als bisher bekannt. Es gibt neue Ansätze, die sich mit diesem komplexen Netzwerk auseinander setzen. Dabei werden die vorhandenen Feedforward- und Feedback-Projektionen, wie in der vorliegenden Studie, nach ihrem Ursprung in den infra- und supragranulären Schichten eingeteilt (Markov and Kennedy, 2013). Die hier gefundenen Daten deuten ein globales Feedback aus den infragranulären Schichten und ein lokales Feedback aus den supragranulären Schichten an. Weitere funktionelle und strukturelle Untersuchungen mit einer größeren Stichprobe sind jedoch nötig, um unser Bild dieses Verbindungssystems weiter zu vervollständigen.

## 7 AUSBLICK

Die Daten der vorliegenden Studie lassen einige Fragen offen. Die rekonstruierten Axone fügen sich mit ihrer Morphologie sehr gut in bereits veröffentlichte Daten und bekannte Verarbeitungsprinzipien, wie z.B. über die Entstehung von Richtungsselektivitäten ein. Jedoch ist die Stichprobe mit fünf Axone nicht ausreichend um generelle Aussagen über dieses Feedback-System von PMLS zum primären visuellen Kortex zu treffen. Bei weiterführenden Versuchen sollte vor der Injektion des Tracers in den posteromedialen suprasylvischer Kortex eine Ableitung zur Bestimmung der Richtungs- und Orientierungsselektivität innerhalb der Injektionsstelle erfolgen, um die funktionelle Spezifität der Verbindungen von PMLS nach Area 18 noch deutlicher zu zeigen.

Ein weiterer interessanter Punkt ist der gefundene Unterschied in den Terminationsmustern der Feedback-Projektionen in Abhängigkeit ihrer Lage im visuellen Feld. Die Frage, ob Injektionen in Repräsentationen des peripheren Gesichtsfeldes ähnliche Projektionsmuster in den supragranulären Schichten hervorbringen würden wie beim Totenkopffaffen (Rockland and Knutson, 2000) ist sehr interessant. Ergänzend wäre eine Gegenfärbung der Gewebeserien mit ausgewählten Antikörpern gegen verschiedene funktionelle Populationen von Neuronen auch sehr interessant, um bei direkten Zellkontakten der Terminationen mit diesen Neuronen einen weiteren Aspekt im funktionellen Aufbau hinzufügen zu können.

Des Weiteren wäre die Charakterisierung von weiteren Feedback-Projektionen zwischen unterschiedlichen Arealen, z. B. 21a und dem primären visuellen Kortex interessant. Dabei könnte man überprüfen, ob die hohe Divergenz in den Projektionsmustern nur ein Merkmal der Verbindungen zwischen PMLS und dem primären visuellen Kortex ist, oder ob sich weitere Verbindungen in dieses Schema einfügen.

Bei der Betrachtung der Organisation der Feedback-aussendenden Neuron in PMLS ist die Frage zu klären, ob diese kolumnär angeordnet sind. Zwei anatomische Studien deuten bei der Katze auf diese Anordnung hin (Norita et al., 1996, Kase et al., 1998). Ein mögliches Experiment dazu wäre, über multiple Injektionen in unterschiedliche funktionelle Bereiche des primären visuellen Kortex die Komplexität der Organisation der Neurone in PMLS detaillierter darzustellen. Dabei sollten zusätzlich die Injektionspositionen so gewählt werden, dass neben der Repräsentation des zentralen auch das periphere visuelle Feld abgedeckt wird und es sollte eine genaue Kartierung der Retinotopie in PMLS erfolgen.

## 8 ANHANG

### 8.1 SOFTWARE

Programme	Hersteller	Anwendung
MatLab	MathWorks, Natick, Massachusetts, USA	Datenanalyse
Neurolucida	MicroBrightField, Inc., Colchester, USA	3D-Neuronrekonstruktion und Morphometrie
Adobe PhotoShop CS3	Adobe Systems, Kalifornien, USA	Bildbearbeitung
Adobe Illustrator CS5	Adobe Systems, Kalifornien, USA	Bildbearbeitung
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond USA	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation
Statview	Abacus Software, Berkeley, USA	Statistische Auswertung

### 8.2 FÄRBEMETHODEN

#### 8.2.1 BDA-FÄRBUNG

Ablauf der BDA-Färbung	Dauer
Waschen der Schnitte in TBS	3x 10 min
Inkubation in 70% Methanol mit 0,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 min
Waschen der Schnitte in TBS	3x 10 min
Waschen der Schnitte in TBS +0,5% Triton	3x 30 min
Inkubation in ABC-Kit: 60 µl Lösung A und 60 µl von Lösung B pro 10 ml TBST	90 min
Waschen der Schnitte in TB	4x 20 min
Inkubation der Schnitte in TB und 0,4% Ammonium-Nickelsulfat	10 min
Inkubation der Schnitte in TB und 0,4% Ammonium-Nickelsulfat und DAB 15 mg/100 ml	10 min
Zugabe von 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (40µl in 100 ml H <sub>2</sub> O)	15 min
Waschen der Schnitte in TB	3x 10 min
Aufziehen der Schnitte auf gelatinisierte Objektträger	
Entwässern in EtOH 70%	> 2 min
Entwässern in EtOH 96%	> 2 min
Entwässern in Isopropanol	> 2 min
Entwässern in Xylol	3 min
Eindecken der Schnitte mit Epoxidharz	

### 8.2.2 NISSL-FÄRBUNG

Inkubation der Schnitte in	Dauer	
H <sub>2</sub> O	2 min	
EtOH 70%	5 min	
EtOH 96%	5 min	
EtOH 96%	2 min	
2x H <sub>2</sub> O	2 min	
Kaliumdisulfit	15 min	(nicht bei vorheriger BDA-Färbung)
H <sub>2</sub> O	spülen	
Kresylviolett	3-5 min	Färbegrad beobachten
Acetatpuffer	2 min	
EtOH 70%	> 2 min	Färbung differenzieren
EtOH 96%	> 2 min	bis weiße Substanz
Isopropanol	> 2 min	entfärbt ist
Xylol	3 min	

### 8.3 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Chemikalie	Bezugsquelle
3,3'-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumchlorid	Fluka BioChemika, Steinheim
Ammonium-Nickelsulfat Hexahydrat	Fluka BioChemika, Steinheim
D-Glukose	Fluka BioChemika, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Eukitt	Kindler, Freiburg
Gelatine (vom Schwein)	Sigma-Aldrich, München
Glukose-Oxydase	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumchrom(III)-sulfat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhypochloritlösung	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Shandon Xylene Substitute	Thermo Electron Corporation, Runcorn UK
Shandon Xylene Substitute Mountant	Shandon Xylene Substitute Mountant
Tris Base	Sigma-Aldrich, München



Triton® X-100	Fluka BioChemika,
Agar	Merck, Darmstadt
Violet Cresyl	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, USA

#### 8.4 ZUSAMMENSETZUNG VERWENDETER LÖSUNGEN

Lösung	Bestandteile
Gelatinelösung für Objektträgerbeschichtung	0,5% Gelatine
	1mM $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
	in Aqua dest.
$\text{H}_2\text{O}_2$ -Methanollösung	0,5% $\text{H}_2\text{O}_2$ in 70% Methanol in Aqua dest.
Natriumacetatpuffer (pH 6)	0,2 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ in Aqua dest.
Paraformaldehyd 4% (pH 7,4)	4% Paraformaldehyd
	in PBS 0,1M
PB (pH 7,4)	0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl
	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	6,4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	2,7 mM KCl
	in Aqua dest.
TBS (pH 7,4)	0,05 M Tris base, 0,15 M NaCl in Aqua dest.
TBS-Triton® X	1% Triton® X 100
	in 0,05 M TBS in Aqua dest.
TB (pH7,4)	0,05 M Tris base in Aqua dest.

## 8.5 VERSUCHSTIERE

Katze	Alter	Gewicht	Methoden	Auswertung
1	4	4	Druckinjektion BDA in PMLS	Axonrekonstruktion von PMLS in den primären visuellen Kortex
2	2	3		Horizontal und koronare Gewebeübersichten mit Nissl- und Gallyas-Färbungen
3	3	3,3	Druckinjektion BDA in Areal 18 beide Hemisphären	Übersicht über Ausdehnungen von unterschiedlichen Druckinjektionen
4	2	3,6	Druckinjektion DA in rechte und linke Hemisphäre in Areal 18	Axonrekonstruktion von PMLS in den primären visuellen Kortex und Analyse der Verteilung von retrograd markierten Zellkörper in PMLS und CGL
5	3	5,3	Druckinjektion DA in rechte und linke Hemisphäre in Areal 18	Analyse der Verteilung von retrograd markierten Zellkörpern in PMLS und CGI

## 8.6 MEDIKAMENTE

Arzneimittel	Wirkungsweise	Wirkstoffname	Verabreichung
Atropin (0,1 mg/kg)	Gegen Übelkeit, zur Anhebung der Herzfrequenz, zur Speichelreduktion und Bronchialdilatation	Atropinsulfat	Während der Narkoseeinleitung
Convenia® (8 mg/kg)	Antibiotikum	Cefovecin	1. Tag postoperativ
Ketanest® S (10 mg/kg) + NaCl	Hypnotikum und potentes Analgetikum	Ketamin + NaCl	Nachnarkose
Pancuronium® (0,8 mg/ml)	Muskelrelaxans	Pancuroniumbromid	Vor Beginn der visuellen Stimulation
Paraxin (0,2 mg/kg i.m.)	Antibiotikum	Chloramphenicol	1., 3., 5., 6. Tag postoperativ
Rimadyl® (5 mg/kg, 1:1 i.v. und s.c.)	Schmerzlindernde, fiebersenkende und entzündungshemmende Wirkung über COX-Inhibition	Carprofen	1.-2. Tag postoperativ
Rompun® (0,1 mg/kg) + Ketanest® S (10 mg/kg)	Rompun: antagonistisierbares Sedativum und Analgetikum; Ketamin: Hypnotikum und potentes Analgetikum	Xylazinhydrochlorid, Ketaminhydrochlorid	Initialnarkose
Veracin® (0,1 mg/kg, s.c. oder i.m.)	Antibiotikum	Benzylpenicillin-Benzathin	1., 4., 6. Tag postoperativ
Voren® (1 mg /kg)	Glucocorticoid eingesetzt zur Prophylaxe von Hirnödemen	Dexamethason	Vor Beginn der Kraniotomie, 1.-3. Tag postoperativ
Xylocain®	Natrium-Kanal-Hemmer	Xylocain	Spray, Gel

## 8.7 ROHDATEN

### 8.7.1 NEURONENVERTEILUNG IN PMLS

Kortikale Schicht	F+	R+	F+&R+	Summe
I	0	0	0	0
II	66	10	1	77
III	697	145	134	976
IV	25	6	3	34
V	914	263	375	1552
VI	1011	368	54	1433
<b>Summe</b>	<b>2713</b>	<b>792</b>	<b>567</b>	<b>4072</b>

**Tabelle 1:** Absolute Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS von Katze 4

Kortikale Schicht	F+	R+	F+&R+
I	0	0	0
II	2	0	0
III	17	4	3
IV	1	0	0
V	22	6	9
VI	25	9	1

**Tabelle 2:** Prozentuale Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS von Katze 4

Kortikale Schicht	F+	R+	F+&R+	Summe
I	0	0	0	0
II	426	280	7	713
III	1687	762	51	2500
IV	42	22	0	64
V	1667	1353	339	3359
VI	1906	1358	307	3571
<b>Summe</b>	<b>5728</b>	<b>3775</b>	<b>704</b>	<b>10207</b>

**Tabelle 3:** Absolute Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS von Katze 5

Kortikale Schicht	F+	R+	F+&R+
I	0	0	0
II	4	3	0
III	17	7	0
IV	0	0	0
V	16	13	3
VI	19	13	3

**Tabelle 4:** Prozentuale Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS von Katze 5

Kortikale Schicht	F+	R+	F+&R+
I	0	0	0
II	3	1	0
III	17	6	2
IV	1	0	0
V	19	10	6
VI	22	11	2

**Tabelle 5:** Prozentuale Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS von Katze 4 und 5

Kortikale Schicht	F+	R+	F+&R+
I	0,00	0,00	0,00
II	1,28	1,25	0,02
III	0,29	1,95	1,40
IV	0,10	0,03	0,04
V	3,06	3,40	2,94
VI	3,08	2,13	0,84

**Tabelle 6:** Standardabweichung des Mittelwertes der prozentualen Verteilung der retrograd markierten Neurone in PMLS von Katze 4 und 5

### 8.7.2 SOMAFLÄCHE DER RETROGRAD MARKIERTEN NEURONE IN PMLS

Kortikale Schicht	F <sup>+</sup>	R <sup>+</sup>	F+&R <sup>+</sup>
III	245,18	253,48	276,83
V	314,20	298,70	430,76
VI	287,68	283,63	328,79

**Tabelle 7:** Durchschnittliche Somafläche ( $\mu\text{m}^2$ ) pro kortikaler Schicht und retrograder Markierung

Kortikale Schicht	F <sup>+</sup>	R <sup>+</sup>	F+&R <sup>+</sup>
III	75,78	76,71	86,75
V	148,5	103,55	196,51
VI	74,99	81,48	103,20

**Tabelle 8:** Standardabweichung der durchschnittlichen Somafläche pro kortikaler Schicht und retrograder Markierung

	III	V	VI
F+ zu R+	0,2488	0,9212	0,2567
F+ zu F+&R+	0,0006	<0,0001	<0,0001
R+ zu F+&R+	0,0337	<0,0001	<0,0001

**Tabelle 9:** P-Werte des Mann-Whitney-U Tests

### 8.7.3 NEURONENVERTEILUNG IM CGL

<b>CGL</b>	<b>F+</b>	<b>R+</b>	<b>F+&amp;R+</b>
<b>Katze 4</b>	1252	1141	882
<b>Katze 5</b>	1638	1585	221
<b>PMLS</b>	<b>F+</b>	<b>R+</b>	<b>F+&amp;R+</b>
<b>Katze 4</b>	5728	3775	704
<b>Katze 5</b>	2713	792	567

**Tabelle 10:** Absolute Verteilung der retrograd markierten Neurone im CGL und im Areal PMLS bei Katze 4 und 5

<b>Anatomische Struktur</b>	<b>F+</b>	<b>R+</b>	<b>F+&amp;R+</b>
<b>CGL</b>	42,89	40,43	16,67
<b>PMLS</b>	61,37	28,22	10,41

**Tabelle 11:** Prozentuale Verteilung der retrograd markierten Neurone im CGL und im Areal PMLS

<b>Anatomische Struktur</b>	<b>F+</b>	<b>R+</b>	<b>F+&amp;R+</b>
<b>LGN</b>	4,67	5,59	10,26
<b>PMLS</b>	5,25	8,77	3,51

**Tabelle 12:** Standardabweichung des Mittelwertes der Verteilung der retrograd markierten Neurone im CGL und in PMLS

### 8.7.4 AXONDATEN

<b>Axon</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Knoten	96	26	2	16	30
Gesamtlänge (µm)	76832,2	24797,2	14575,5	30396,6	28468
Verzweigungsorder	20	11	3	8	9
Anzahl Boutons	4878	931	284	281	322
Boutondichte pro mm	63,49	37,54	19,48	9,24	11,31
Terminationsfelder	4	4	1	3	4
Areale	18 (4)	17 (1) 18 (3)	18 (1)	17 (2) 18 (1)	18 (4)

**Tabelle 13:** Übersichtsdaten der Axone

<b>Ausdehnung in µm</b>	<b>anterior-posterior</b>	<b>medial-lateral</b>	<b>dorsal-ventral</b>
<b>Axon 1</b>	4520,5	7278,7	1525 (3660)
T1	1054,1	395,8	100 (240)
T2	1485,7	2064,3	500 (1200)
T3	2191,5	567,7	275 (660)
T4	1665,5	1245,6	750 (1800)
<b>Axon 2</b>	7513,7	4067	1150 (2760)
T1	1334,7	579	175 (240)
T2	1156,6	1923,5	575 (1380)
T3	1439,3	1590,2	400 (960)
T4	1148,1	502,8	200 (480)
<b>Axon 3</b>	5502,4	3555,2	840 (1680)
T1	2245,8	413,6	330 (660)
<b>Axon 4</b>	5637,9	7877,9	2250 (4500)
T1	950,1	1369,9	420 (840)
T2	3198,2	1629,7	420 (840)
T3	825,7	499,9	210 (420)
<b>Axon 5</b>	4966,3	6815,3	3390 (6780)
T1	1286,5	698,3	660 (1320)
T2	1769,1	873,1	510 (1020)
T3	1256,9	382,5	240 (480)
T4	1450,8	478,9	540 (1080)

**Tabelle 14:** Ausdehnung der Axone, bei der D-V-Ausdehnung ist die korrigierte Ausdehnung ohne Schrumpfung im Klammern angegeben.

<b>Axon 1</b>							
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Schicht I</b>	<b>Schicht II</b>	<b>Schicht III</b>	<b>Schicht IV</b>	<b>Schicht V</b>	<b>Schicht VI</b>
Area 18	T1	0	0	2	177	108	24
Area 18	T2	0	34	742	235	457	246
Area 18	T3	0	0	0	65	2151	0
Area 18	T4	0	0	0	12	624	1
<b>Axon 2</b>							
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Schicht I</b>	<b>Schicht II</b>	<b>Schicht III</b>	<b>Schicht IV</b>	<b>Schicht V</b>	<b>Schicht VI</b>
Area 18	T1	0	0	105	8	40	0
Area 18	T2	0	0	0	0	0	82
Area 17	T3	0	0	0	259	79	15

Area 18	T4	0	0	0	0	0	343
<b>Axon 3</b>							
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Schicht I</b>	<b>Schicht II</b>	<b>Schicht III</b>	<b>Schicht IV</b>	<b>Schicht V</b>	<b>Schicht VI</b>
Area 18	T1	0	0	0	0	158	126
<b>Axon 4</b>							
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Schicht I</b>	<b>Schicht II+III</b>		<b>Schicht IV</b>	<b>Schicht V</b>	<b>Schicht VI</b>
Area 17	T1	0	0		35	16	63
Area 17	T2	0	13		24	0	7
Area 18	T3	0	0		0	0	123
<b>Axon 5</b>							
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Schicht I</b>	<b>Schicht II</b>	<b>Schicht III</b>	<b>Schicht IV</b>	<b>Schicht V</b>	<b>Schicht VI</b>
Area 18	T1	0	0	0	7	25	98
Area 18	T2	0	0	0	6	43	33
Area 18	T3	0	0	0	0	0	35
Area 18	T4	0	1	56	0	2	16

**Tabelle 15:** Verteilung der Boutons nach Areal, Terminationsgebiet und Schichtzugehörigkeit

<b>Axon 1</b>					
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Länge in µm</b>	<b>Boutons</b>	<b>Dichte/µm</b>	<b>Dichte/mm</b>
Area 18	T1	4772,1	311	0,07	65,17
Area 18	T3	24790,6	1714	0,07	69,14
Area 18	T4	23928,5	2216	0,09	92,61
Area 18	T5	12887,5	637	0,05	49,43
<b>Axon 2</b>					
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Länge in µm</b>	<b>Boutons</b>	<b>Dichte/µm</b>	<b>Dichte/mm</b>
Area 18	T1	2709,4	153	0,06	56,47
Area 18	T2	3616,8	82	0,02	22,67
Area 17	T3	7085,6	353	0,05	49,82
Area 18	T4	6235	343	0,06	55,01
<b>Axon 3</b>					
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Länge in µm</b>	<b>Boutons</b>	<b>Dichte/µm</b>	<b>Dichte/mm</b>
Area 18	T1	5668,1	284	0,05	50,10
<b>Axon 4</b>					
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Länge in µm</b>	<b>Boutons</b>	<b>Dichte/µm</b>	<b>Dichte/mm</b>
Area 17	T1	8906,3	114	0,01	12,80
Area 17	T2	4660,5	44	0,01	9,44
Area 18	T3	3271,3	123	0,04	37,60
<b>Axon 5</b>					
<b>Areal</b>	<b>T-Gebiet</b>	<b>Länge in µm</b>	<b>Boutons</b>	<b>Dichte/µm</b>	<b>Dichte/mm</b>
Area 18	T1	7946,1	130	0,02	16,36
Area 18	T2	4405,2	82	0,02	18,61
Area 18	T3	2047,9	35	0,02	17,09
Area 18	T4	3478,1	75	0,02	21,56

**Tabelle 16:** Länge der einzelnen Terminationsgebiete und Dichte der Boutons nach Areal und Terminationsgebiet getrennt.

<b>Dichte/mm</b>	<b>Area 18</b>	<b>Area 17</b>
<b>MW</b>	43,99	24,02
<b>Stabw des MW</b>	6,66	12,94

**Tabelle 17:** Dichte /mm der Terminationsgebiete in einem Areal

<b>Axon 1</b>					
<b>T-Gebiet</b>	<b>Areal</b>	<b>Länge (µm)</b>	<b>Volumen (µm³)</b>	<b>Knoten</b>	<b>Boutons/mm</b>
T1	18	4772,1	101,13	40	65,17
T2	18	24790,6	663,80	27	69,14
T3	18	23928,5	700,80	12	92,61
T4	18	12887,5	351,48	14	49,43
<b>Axon 2</b>					
T1	18	2709,4	121,88	2	56,47
T2	18	3616,8	110,95	2	22,67
T3	17	7085,6	<b>189,59</b>	4	49,82
T4	18	6235	166,83	18	55,01
<b>Axon 3</b>					
T1	18	5668,1	206,65	2	50,10
<b>Axon 4</b>					
T1	17	8906,3	<b>298,41</b>	7	12,80
T2	17	4660,5	<b>301,23</b>	1	9,44
T3	18	3271,3	276,58	6	37,60
<b>Axon 5</b>					
T1	18	7946,1	929,02	12	16,36
T2	18	4405,2	508,40	5	18,61
T3	18	2047,9	293,27	4	17,09
T4	18	3478,1	565,44	6	21,56

Tabelle 18: Volumen der Terminationsgebiete

<b>Volumen (µm³)</b>	<b>Area 18</b>	<b>Area 17</b>
<b>MW</b>	449,37	263,08
<b>Stabw des MW</b>	84,49	36,75

Tabelle 19: Volumen der Terminationsgebiete pro Areal

	<b>Axon 1</b>	<b>Axon 2</b>	<b>Axon 3</b>	<b>Axon 4</b>	<b>Axon 5</b>
<b>Verzweigungsorder</b>	<b>Dichte/mm</b>	<b>Dichte/mm</b>	<b>Dichte/mm</b>	<b>Dichte/mm</b>	<b>Dichte/mm</b>
<b>1. Order</b>	0	1	0	0	0
<b>2. Order</b>	0,4	8,9	47,6	3,2	0
<b>3. Order</b>	5,4	26,4	60,8	10,6	7,8
<b>4. Order</b>	40,4	53		31,1	7,4
<b>5. Order</b>	37,6	58,2		26,6	26,8
<b>6. Order</b>	73,6	65,8		18,3	17,2
<b>7. Order</b>	67,7	62,8		15,3	21,9
<b>8. Order</b>	79,7	61,7		13	30,4
<b>9. Order</b>	76,8	90,4			47,6
<b>10. Order</b>	77	65,6			
<b>11. Order</b>	93,9	121,7			
<b>12. Order</b>	69,8				
<b>13. Order</b>	52,4				
<b>14. Order</b>	80,7				
<b>15. Order</b>	58,9				
<b>16. Order</b>	177,7				
<b>17. Order</b>	111,4				
<b>18. Order</b>	127,2				
<b>19. Order</b>	120,7				
<b>20. Order</b>	101,7				

Tabelle 20: Dichte der Boutons pro Verzweigungsorder



Verzweigungsorder	Axon 1		Axon 2	
	Anzahl	Länge in $\mu\text{m}$	Anzahl	Länge in $\mu\text{m}$
1	1	7052,8	1	6184,3
2	2	2829,2	2	1120,3
3	4	2936,6	4	4691,6
4	8	2427,3	6	2171,1
5	12	2765,2	8	4467,3
6	17	8814,8	8	2813,3
7	19	5424,6	8	1416,8
8	27	15474,9	6	858,3
9	23	6890,4	4	387,1
10	18	2738,8	4	564,2
11	23	10843,1	2	123,3
12	10	5427,3		
13	6	477		
14	6	2033,4		
15	3	17		
16	4	236,4		
17	4	35,9		
18	2	157,2		
19	4	132,6		
20	2	118		

Tabelle 21: Gesamtlänge der Axonsegmente pro Verzweigungsorder für Axon 1 und Axon 2

Verzweigungsorder	Axon 3		Axon 4		Axon 5	
	Anzahl	Länge in $\mu\text{m}$	Anzahl	Länge in $\mu\text{m}$	Anzahl	Länge in $\mu\text{m}$
1	1	9455	1	12186,4	1	10215,8
2	2	2078,6	2	1540,9	2	367,1
3	2	3041,8	4	5182,9	4	4082
4			6	1638,8	6	1879,7
5			4	1129,7	12	2569,9
6			6	3489,6	16	6399,3
7			6	1767,7	8	1049
8			4	3460,9	8	1548,1
9					4	357,2

Tabelle 22: Gesamtlänge der Axonsegmente pro Verzweigungsorder für Axon 3 bis 5

### 8.7.5 FILMÜBERSICHT

Die Filmsequenzen starten immer mit der Ansicht der entsprechenden Abbildung (Aufsicht), danach wird in die Lateralansicht gewechselt und die Rekonstruktion dreht sich um die d-v Achse.

Film	Inhalt
Film 4.24	Abbildung 4.24: Komplettrekonstruktion von Axon 1
Film 4.25	Abbildung 4.25: Detailansicht des ersten Terminationsfeldes (T1) von Axon 1
Film 4.26	Abbildung 4.26: Detailansicht des zweiten Terminationsfeldes (T2) von Axon 1
Film 4.27	Abbildung 4.27: Detailansicht des dritten Terminationsfeldes (T3) von Axon 1
Film 4.28	Abbildung 4.28: Detailansicht des vierten Terminationsfeldes (T4) von Axon 1
Film 4.29	Abbildung 4.29: Komplettrekonstruktion von Axon 2
Film 4.30	Abbildung 4.30: Detailansicht des ersten Terminationsfeldes (T1) von Axon 2
Film 4.31	Abbildung 4.31: Detailansicht des zweiten Terminationsfeldes (T2) von Axon 2
Film 4.32	Abbildung 4.32: Detailansicht des dritten Terminationsfeldes (T3) von Axon 2
Film 4.33	Abbildung 4.33: Detailansicht des vierten Terminationsfeldes (T4) von Axon 2
Film 4.34	Abbildung 4.34: Komplettrekonstruktion von Axon 3
Film 4.35	Abbildung 4.35: Detailansicht des Terminationsgebietes von Axon 3
Film 4.36	Abbildung 4.36: Komplettrekonstruktion von Axon 4
Film 4.37	Abbildung 4.37: Detailansicht des ersten Terminationsgebietes (T1) von Axon 4
Film 4.38	Abbildung 4.38: Detailansicht des zweiten Terminationsgebietes (T2) von Axon 4
Film 4.39	Abbildung 4.39: Detailansicht des dritten Terminationsgebietes (T3) von Axon 4
Film 4.42	Abbildung 4.42: Komplettrekonstruktion von Axon 5
Film 4.43	Abbildung 4.43: Detailansicht des ersten Terminationsgebietes (T1) von Axon 5
Film 4.44	Abbildung 4.44: Detailansicht des zweiten Terminationsgebietes (T2) von Axon 5
Film 4.45	Abbildung 4.45: Detailansicht des dritten Terminationsgebietes (T3) von Axon 5
Film 4.46	Abbildung 4.46: Detailansicht des vierten Terminationsgebietes (T4) von Axon 5
Film 4.47	Abbildung 4.47: Aufsicht auf die Axone 1 (rosa) und 2 (hellblau)
Film 4.50	Abbildung 4.50: Aufsicht auf die Axone 3 (dunkelblau), 4 (rosa) und 5 (hellblau)
Film 4.50a	Abbildung 4.50: Aufsicht auf die Axone 3, 4 und 5 mit Kortexoberfläche und Referenzmarkierungen (rot)

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- Aiger AN, S. (1997) Immunchemie. Grundlagen - Anwendungen - Perspektiven.: Spektrum Akademischer Verlag.
- Albright TD (1984) Direction and orientation selectivity of neurons in visual area MT of the macaque. *J Neurophysiol* 52:1106-1130.
- Albright TD, Desimone R, Gross CG (1984) Columnar organization of directionally selective cells in visual area MT of the macaque. *J Neurophysiol* 51:16-31.
- Anderson JC, Binzegger T, Douglas RJ, Martin KA (2002) Chance or design? Some specific considerations concerning synaptic boutons in cat visual cortex. *J Neurocytol* 31:211-229.
- Bear M, Paradiso M, Connors BW (2006) Neuroscience: Exploring the Brain Lippincott Williams & Wilkins.
- Berman NE, Wilkes ME, Payne BR (1987) Organization of orientation and direction selectivity in areas 17 and 18 of cat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 58:676-699.
- Blakemore C, Tobin EA (1972) Lateral inhibition between orientation detectors in the cat's visual cortex. *Exp Brain Res* 15:439-440.
- Blasdel GG, Lund JS (1983) Termination of afferent axons in macaque striate cortex. *J Neurosci* 3:1389-1413.
- Bonhoeffer T, Grinvald A (1993a) The layout of iso-orientation domains in area 18 of cat visual cortex: optical imaging reveals a pinwheel-like organization. *J Neurosci* 13:4157-4180.
- Bonhoeffer T, Grinvald A (1993b) Optical imaging of the functional architecture in cat visual cortex: the layout of direction and orientation domains. *Adv Exp Med Biol* 333:57-69.
- Bosking WH, Zhang Y, Schofield B, Fitzpatrick D (1997) Orientation selectivity and the arrangement of horizontal connections in tree shrew striate cortex. *J Neurosci* 17:2112-2127.
- Brandt HM, Apkarian AV (1992) Biotin-dextran: a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. *J Neurosci Methods* 45:35-40.
- Buhl EH, Singer W (1989) The callosal projection in cat visual cortex as revealed by a combination of retrograde tracing and intracellular injection. *Exp Brain Res* 75:470-476.
- Burke W, Dreher B, Wang C (1998) Selective block of conduction in Y optic nerve fibres: significance for the concept of parallel processing. *Eur J Neurosci* 10:8-19.
- Buschman TJ, Miller EK (2007) Top-down versus bottom-up control of attention in the prefrontal and posterior parietal cortices. *Science* 315:1860-1862.
- Callaway EM, Katz LC (1990) Emergence and refinement of clustered horizontal connections in cat striate cortex. *J Neurosci* 10:1134-1153.
- Chen S, Aston-Jones G (1998) Axonal collateral-collateral transport of tract tracers in brain neurons: false anterograde labelling and useful tool. *Neuroscience* 82:1151-1163.
- Cleland BG, Levick WR, Wassle H (1975) Physiological identification of a morphological class of cat retinal ganglion cells. *J Physiol* 248:151-171.
- Crook JM, Kisvarday ZF, Eysel UT (1996) GABA-induced inactivation of functionally characterized sites in cat visual cortex (area 18): effects on direction selectivity. *J Neurophysiol* 75:2071-2088.
- Dann B (2009) Metabolische und hämodynamische Konsequenzen neuronaler Aktivität im visuellen Kortex. In: Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Fakultät für

- Naturwissenschaften, Institut für Biologie: Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Das A, Gilbert CD (1999) Topography of contextual modulations mediated by short-range interactions in primary visual cortex. *Nature* 399:655-661.
- Diogo AC, Soares JG, Koulakov A, Albright TD, Gattass R (2003) Electrophysiological imaging of functional architecture in the cortical middle temporal visual area of *Cebus apella* monkey. *J Neurosci* 23:3881-3898.
- Dreher B, Wang C, Burke W (1996a) Limits of parallel processing: excitatory convergence of different information channels on single neurons in striate and extrastriate visual cortices. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:913-925.
- Dreher B, Wang C, Turlejski KJ, Djavadian RL, Burke W (1996b) Areas PMLS and 21a of cat visual cortex: two functionally distinct areas. *Cereb Cortex* 6:585-599.
- Duke-Elder S, Scott, G. (1971) *Neuroophthalmology*. London: Henry Kimpton.
- Einstein G, Fitzpatrick D (1991) Distribution and morphology of area 17 neurons that project to the cat's extrastriate cortex. *J Comp Neurol* 303:132-149.
- Elston GN, Rockland KS (2002) The pyramidal cell of the sensorimotor cortex of the macaque monkey: phenotypic variation. *Cereb Cortex* 12:1071-1078.
- Eysel UT, Mücke T, Worgotter F (1988) Lateral interactions at direction-selective striate neurones in the cat demonstrated by local cortical inactivation. *J Physiol* 399:657-675.
- Farinas I, DeFelipe J (1991) Patterns of synaptic input on corticocortical and corticothalamic cells in the cat visual cortex. I. The cell body. *J Comp Neurol* 304:53-69.
- Felleman DJ, Van Essen DC (1991) Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1:1-47.
- Frey S (2006) *Neuroanatomische Untersuchungen zur funktionellen Topographie kortikaler Rückprojektionen*. TU Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Friston K (2005) A theory of cortical responses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:815-836.
- Fritzsche B (1993) Fast axonal diffusion of 3000 molecular weight dextran amines. *J Neurosci Methods* 50:95-103.
- Fukuda T, Kosaka T, Singer W, Galuske RA (2006) Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network. *J Neurosci* 26:3434-3443.
- Galuske RA, Schmidt KE, Goebel R, Lomber SG, Payne BR (2002) The role of feedback in shaping neural representations in cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:17083-17088.
- Galuske RA, Singer W (1996) The origin and topography of long-range intrinsic projections in cat visual cortex: a developmental study. *Cereb Cortex* 6:417-430.
- Gilbert CD, Kelly JP (1975) The projections of cells in different layers of the cat's visual cortex. *J Comp Neurol* 163:81-105.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1983) Clustered intrinsic connections in cat visual cortex. *J Neurosci* 3:1116-1133.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1989) Columnar specificity of intrinsic horizontal and corticocortical connections in cat visual cortex. *J Neurosci* 9:2432-2442.
- Gimlich RL, Braun J (1985) Improved fluorescent compounds for tracing cell lineage. *Dev Biol* 109:509-514.
- Gizzi MS, Katz E, Movshon JA (1990) Spatial and temporal analysis by neurons in the representation of the central visual field in the cat's lateral suprasylvian visual cortex. *Vis Neurosci* 5:463-468.

- Glaser JR, Glaser EM (1990) Neuron imaging with Neurolucida--a PC-based system for image combining microscopy. *Comput Med Imaging Graph* 14:307-317.
- Glover JC, Petursdottir G, Jansen JK (1986) Fluorescent dextran-amines used as axonal tracers in the nervous system of the chicken embryo. *J Neurosci Methods* 18:243-254.
- Grant S, Hilgetag CC (2005) Graded classes of cortical connections: quantitative analyses of laminar projections to motion areas of cat extrastriate cortex. *Eur J Neurosci* 22:681-696.
- Grinvald A, Shoman, D., Shmuel, A., Vanzetta, I., Shtoyerman, E., Slovlin, H., Sterkin, A., Wijnbergen, C., Hildesheim, R. & Arieli, A. (2001) In-vivo Optical imaging of cortical architecture and dynamics. vol. Technical Report GC-AG/99-6 Modern Techniques in Neuroscience Research. : U. Windhorst and H. Johansson (Editors) Springer Verlag.
- Haupt C, Huber AB (2008) How axons see their way--axonal guidance in the visual system. *Front Biosci* 13:3136-3149.
- Hayhow WR (1958) The cytoarchitecture of the lateral geniculate body in the cat in relation to the distribution of crossed and uncrossed optic fibers. *J Comp Neurol* 110:1-63.
- Hilgetag CC, O'Neill MA, Young MP (2000) Hierarchical organization of macaque and cat cortical sensory systems explored with a novel network processor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:71-89.
- Hoffmann F (2010) Elektrophysiologischen Untersuchungen zu den Grundlagen metabolischer Signale in der Großhirnrinde. In: TU Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Hubel DH (1963) THE VISUAL CORTEX OF THE BRAIN. *Sci Am* 209:54-62.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106-154.
- Hubel DH, Wiesel TN (1974) Sequence regularity and geometry of orientation columns in the monkey striate cortex. *J Comp Neurol* 158:267-293.
- Hubener M, Shoham D, Grinvald A, Bonhoeffer T (1997) Spatial relationships among three columnar systems in cat area 17. *J Neurosci* 17:9270-9284.
- Hupe JM, James AC, Girard P, Lomber SG, Payne BR, Bullier J (2001) Feedback connections act on the early part of the responses in monkey visual cortex. *J Neurophysiol* 85:134-145.
- Hupe JM, James AC, Payne BR, Lomber SG, Girard P, Bullier J (1998) Cortical feedback improves discrimination between figure and background by V1, V2 and V3 neurons. *Nature* 394:784-787.
- Jobsis FF (1977) Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198:1264-1267.
- Johnson RR, Burkhalter A (1996) Microcircuitry of forward and feedback connections within rat visual cortex. *J Comp Neurol* 368:383-398.
- Karube F, Kisvarday ZF (2011) Axon topography of layer IV spiny cells to orientation map in the cat primary visual cortex (area 18). *Cereb Cortex* 21:1443-1458.
- Kase M, Hoshino K, Norita M (1998) Laminar organization of the intrinsic connection neurons and their axon terminals in the lateral suprasylvian cortex of the cat. *Neurobiology (Bp)* 6:295-314.
- Kennedy H, Bullier J (1985) A double-labeling investigation of the afferent connectivity to cortical areas V1 and V2 of the macaque monkey. *J Neurosci* 5:2815-2830.

- Kisvarday ZF, Toth E, Rausch M, Eysel UT (1997) Orientation-specific relationship between populations of excitatory and inhibitory lateral connections in the visual cortex of the cat. *Cereb Cortex* 7:605-618.
- Kobbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62:327-351.
- Lang G (2006) *Histotechnik, Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*: Springer Wien New York.
- Latties AM, Sprague JM (1966) The projection of optic fibers to the visual centers in the cat. *J Comp Neurol* 127:35-70.
- Lee C, Weyand TG, Malpeli JG (1998) Thalamic control of cat area-18 supragranular layers: simple cells, complex cells, and cells projecting to the lateral suprasylvian visual area. *Vis Neurosci* 15:27-35.
- Lei W, Jiao Y, Del Mar N, Reiner A (2004) Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J Neurosci* 24:8289-8299.
- Lomber SG, Payne BR, Cornwell P, Long KD (1996) Perceptual and cognitive visual functions of parietal and temporal cortices in the cat. *Cereb Cortex* 6:673-695.
- Lowenstein PR, Somogyi P (1991) Synaptic organization of cortico-cortical connections from the primary visual cortex to the posteromedial lateral suprasylvian visual area in the cat. *J Comp Neurol* 310:253-266.
- Luhmann HJ, Martinez Millan L, Singer W (1986) Development of horizontal intrinsic connections in cat striate cortex. *Exp Brain Res* 63:443-448.
- Luo P, Haines A, Dessem D (2001) Elucidation of neuronal circuitry: protocol(s) combining intracellular labeling, neuroanatomical tracing and immunocytochemical methodologies. *Brain Res Brain Res Protoc* 7:222-234.
- Malach R, Tootell RB, Malonek D (1994) Relationship between orientation domains, cytochrome oxidase stripes, and intrinsic horizontal connections in squirrel monkey area V2. *Cereb Cortex* 4:151-165.
- Malonek D, Tootell RB, Grinvald A (1994) Optical imaging reveals the functional architecture of neurons processing shape and motion in owl monkey area MT. *Proc Biol Sci* 258:109-119.
- Mann HB, Whitney DR (1947) On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics* 18:50-60.
- Markov NT, Kennedy H (2013) The importance of being hierarchical. *Curr Opin Neurobiol*.
- Maunsell JH, van Essen DC (1983) The connections of the middle temporal visual area (MT) and their relationship to a cortical hierarchy in the macaque monkey. *J Neurosci* 3:2563-2586.
- McDonald CT, Burkhalter A (1993) Organization of long-range inhibitory connections with rat visual cortex. *J Neurosci* 13:768-781.
- Mignard M, Malpeli JG (1991) Paths of information flow through visual cortex. *Science* 251:1249-1251.
- Mountcastle VB (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 ( Pt 4):701-722.
- Nance DM, Burns J (1990) Fluorescent dextrans as sensitive anterograde neuroanatomical tracers: applications and pitfalls. *Brain Res Bull* 25:139-145.
- Niessing J, Ebisch B, Schmidt KE, Niessing M, Singer W, Galuske RA (2005) Hemodynamic signals correlate tightly with synchronized gamma oscillations. *Science* 309:948-951.

- Norita M, Kase M, Hoshino K, Meguro R, Funaki S, Hirano S, McHaffie JG (1996) Extrinsic and intrinsic connections of the cat's lateral suprasylvian visual area. *Prog Brain Res* 112:231-250.
- O'Leary JL (1940) A structural analysis of the lateral geniculate nucleus of the cat. *The Journal of Comparative Neurology* 73:405-430.
- Otsuka R, Hassler R (1962) [On the structure and segmentation of the cortical center of vision in the cat]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* 203:212-234.
- Palmer LA, Rosenquist AC, Tusa RJ (1978) The retinotopic organization of lateral suprasylvian visual areas in the cat. *J Comp Neurol* 177:237-256.
- Payne BR, Connors C, Cornwell P (1991) Survival and death of neurons in cortical area PMLS after removal of areas 17, 18, and 19 from cats and kittens. *Cereb Cortex* 1:469-491.
- Payne BR, Lomber SG (2003) Quantitative analyses of principal and secondary compound parieto-occipital feedback pathways in cat. *Exp Brain Res* 152:420-433.
- Pernberg J, Jirrmann KU, Eysel UT (1998) Structure and dynamics of receptive fields in the visual cortex of the cat (area 18) and the influence of GABAergic inhibition. *Eur J Neurosci* 10:3596-3606.
- Rajakumar N, Elisevich K, Flumerfelt BA (1993) Biotinylated dextran: a versatile anterograde and retrograde neuronal tracer. *Brain Res* 607:47-53.
- Raju DV, Smith Y (2006) Anterograde axonal tract tracing. *Curr Protoc Neurosci Chapter* 1:Unit 1 14.
- Rao RP, Ballard DH (1999) Predictive coding in the visual cortex: a functional interpretation of some extra-classical receptive-field effects. *Nat Neurosci* 2:79-87.
- Ratzlaff EH, Grinvald A (1991) A tandem-lens epifluorescence macroscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging. *J Neurosci Methods* 36:127-137.
- Reid RC, Alonso JM (1996) The processing and encoding of information in the visual cortex. *Curr Opin Neurobiol* 6:475-480.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG (2000) Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods* 103:23-37.
- Reinonso-Suarez F (1961) *Topographischer Hirnatlas der Katze*. Darmstadt E. Merck AG.
- Rochefort NL, Buzas P, Quenech'du N, Koza A, Eysel UT, Milleret C, Kisvarday ZF (2009) Functional selectivity of interhemispheric connections in cat visual cortex. *Cereb Cortex* 19:2451-2465.
- Rockland KS (1989) Bistratified distribution of terminal arbors of individual axons projecting from area V1 to middle temporal area (MT) in the macaque monkey. *Vis Neurosci* 3:155-170.
- Rockland KS, Andresen J, Cowie RJ, Robinson DL (1999) Single axon analysis of pulvinocortical connections to several visual areas in the macaque. *J Comp Neurol* 406:221-250.
- Rockland KS, Knutson T (2000) Feedback connections from area MT of the squirrel monkey to areas V1 and V2. *J Comp Neurol* 425:345-368.
- Rockland KS, Lund JS (1982) Widespread periodic intrinsic connections in the tree shrew visual cortex. *Science* 215:1532-1534.
- Rockland KS, Saleem KS, Tanaka K (1994) Divergent feedback connections from areas V4 and TEO in the macaque. *Vis Neurosci* 11:579-600.

- Rockland KS, Virga A (1989) Terminal arbors of individual "feedback" axons projecting from area V2 to V1 in the macaque monkey: a study using immunohistochemistry of anterogradely transported Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 285:54-72.
- Roerig B, Kao JP (1999) Organization of intracortical circuits in relation to direction preference maps in ferret visual cortex. *J Neurosci* 19:RC44.
- Romeis B (1989) *Mikroskopische Technik*: Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore.
- Rudolph KK, Pasternak T (1996) Lesions in cat lateral suprasylvian cortex affect the perception of complex motion. *Cereb Cortex* 6:814-822.
- Salin PA, Bullier J (1995) Corticocortical connections in the visual system: structure and function. *Physiol Rev* 75:107-154.
- Sanderson KJ (1971a) The projection of the visual field to the lateral geniculate and medial interlaminar nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 143:101-108.
- Sanderson KJ (1971b) Visual field projection columns and magnification factors in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Exp Brain Res* 13:159-177.
- Sanides F, Hoffmann J (1969) Cyto- and myeloarchitecture of the visual cortex of the cat and of the surrounding integration cortices. *J Hirnforsch* 11:79-104.
- Schmidt KE, Goebel R, Lowel S, Singer W (1997a) The perceptual grouping criterion of colinearity is reflected by anisotropies of connections in the primary visual cortex. *Eur J Neurosci* 9:1083-1089.
- Schmidt KE, Kim DS, Singer W, Bonhoeffer T, Lowel S (1997b) Functional specificity of long-range intrinsic and interhemispheric connections in the visual cortex of strabismic cats. *J Neurosci* 17:5480-5492.
- Schmidt KE, Lomber SG, Payne BR, Galuske RA (2011) Pattern motion representation in primary visual cortex is mediated by transcortical feedback. *Neuroimage* 54:474-484.
- Shao Z, Burkhalter A (1999) Role of GABAB receptor-mediated inhibition in reciprocal interareal pathways of rat visual cortex. *J Neurophysiol* 81:1014-1024.
- Shipp S, Grant S (1991) Organization of reciprocal connections between area 17 and the lateral suprasylvian area of cat visual cortex. *Vis Neurosci* 6:339-355.
- Shipp S, Zeki S (1989a) The Organization of Connections between Areas V5 and V1 in Macaque Monkey Visual Cortex. *Eur J Neurosci* 1:309-332.
- Shipp S, Zeki S (1989b) The Organization of Connections between Areas V5 and V2 in Macaque Monkey Visual Cortex. *Eur J Neurosci* 1:333-354.
- Shmuel A, Grinvald A (1996) Functional organization for direction of motion and its relationship to orientation maps in cat area 18. *J Neurosci* 16:6945-6964.
- Shoham D, Grinvald A (2001) The cortical representation of the hand in macaque and human area S-I: high resolution optical imaging. *J Neurosci* 21:6820-6835.
- Shoham D, Hubener M, Schulze S, Grinvald A, Bonhoeffer T (1997) Spatio-temporal frequency domains and their relation to cytochrome oxidase staining in cat visual cortex. *Nature* 385:529-533.
- Sholl DA (1956) The measurable parameters of the cerebral cortex and their significance in its organization. *Prog Neurobiol* 324-333.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Somers DC, Todorov EV, Siapas AG, Toth LJ, Kim DS, Sur M (1998) A local circuit approach to understanding integration of long-range inputs in primary visual cortex. *Cereb Cortex* 8:204-217.



- Spear PD, Baumann TP (1975) Receptive-field characteristics of single neurons in lateral suprasylvian visual area of the cat. *J Neurophysiol* 38:1403-1420.
- Spratling MW (2002) Cortical region interactions and the functional role of apical dendrites. *Behav Cogn Neurosci Rev* 1:219-228.
- Spratling MW (2008) Reconciling predictive coding and biased competition models of cortical function. *Front Comput Neurosci* 2:4.
- Stone J, Hansen SM (1966) The projection of the cat's retina on the lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol* 126:601-624.
- Suzuki W, Saleem KS, Tanaka K (2000) Divergent backward projections from the anterior part of the inferotemporal cortex (area TE) in the macaque. *J Comp Neurol* 422:206-228.
- Symonds LL, Rosenquist AC (1984) Corticocortical connections among visual areas in the cat. *J Comp Neurol* 229:1-38.
- Szentagothai J (1975) The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. *Brain Res* 95:475-496.
- Thuma BD (1928) Studies on the diencephalon of the cat. 1. The cyto-architecture of the corpus geniculatum laterale. *J Comp Neur* 46:173-199.
- Tretter F, Cynader M, Singer W (1975) Cat parastriate cortex: a primary or secondary visual area. *J Neurophysiol* 38:1099-1113.
- Tusa RJ, Palmer LA (1980) Retinotopic organization of areas 20 and 21 in the cat. *J Comp Neurol* 193:147-164.
- Tusa RJ, Palmer LA, Rosenquist AC (1978) The retinotopic organization of area 17 (striate cortex) in the cat. *J Comp Neurol* 177:213-235.
- Tusa RJ, Rosenquist AC, Palmer LA (1979) Retinotopic organization of areas 18 and 19 in the cat. *J Comp Neurol* 185:657-678.
- Ungerleider LG, Desimone R (1986) Cortical connections of visual area MT in the macaque. *J Comp Neurol* 248:190-222.
- Updyke BV (1986) Retinotopic organization within the cat's posterior suprasylvian sulcus and gyrus. *J Comp Neurol* 246:265-280.
- Veenman CL, Reiner A, Honig MG (1992) Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J Neurosci Methods* 41:239-254.
- Villeneuve MY, Ptito M, Casanova C (2006) Global motion integration in the postero-medial part of the lateral suprasylvian cortex in the cat. *Exp Brain Res* 172:485-497.
- Wassle H (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5:747-757.
- Westland KW, Burke W (2002) Patterns of X and Y optic nerve fibre terminations in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. *Doc Ophthalmol* 105:129-149.
- Woolsey CN (1981) Cortical sensory organization. Multiple visual areas: The Humana Press Inc., Clifton New Jersey
- Wouterlood FG, Jorritsma-Byham B (1993) The anterograde neuroanatomical tracer biotinylated dextran-amine: comparison with the tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin in preparations for electron microscopy. *J Neurosci Methods* 48:75-87.
- Wouterlood FG, Vinkenoog M, van den Oever M (2002) Tracing tools to resolve neural circuits. *Network* 13:327-342.
- Xue HG, Yang CY, Ito H (2004) The anterograde and retrograde axonal transport of biotinylated dextran amine and biocytin in the nervous system of teleosts. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:106-114.

Zumbroich TJ, Blakemore C (1987) Spatial and temporal selectivity in the suprasylvian visual cortex of the cat. *J Neurosci* 7:482-500.

## PUBLIKATIONEN

Publikationen auf wissenschaftlichen Kongressen:

**Jaehner, N. G., Rothkopf, C. A., Voegler, S., Triesch, J., Galuske, R. A. W. (2012).**

Topographic and functional organization of feedback axons from middle suprasylvian sulcus to primary visual cortex in the cat. FENS Forum Abstr. 2012, 39.38.

**Galuske, R. A. W., Jaehner, N. G., Rothkopf, C. A., Voegler, S., Triesch, J. (2013).**

Topographic and functional organization of feedback connections from middle suprasylvian sulcus to primary visual cortex in the cat. Neuroscience 2013 Abstracts. San Diego, California: Society for Neuroscience, 2013. Online (eingereicht im Mai 2013).

## LEBENS LAUF

Name	Nicole Gerlinde Jähner
Geburtsdatum	03.07.1982
Geburtsort	Berlin

<b>Ausbildung</b>	
04/2008-08/2013	Promotionsstudentin an der TU Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ralf Galuske im Bereich der Systemischen Neurophysiologie, in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main und dem Frankfurt Institute for Advanced Studies in Frankfurt am Main.
05/2007-03/2008	Diplomarbeit an der TU Darmstadt, Arbeitsgruppe Systemische Neurophysiologie mit dem Thema: "Neuroanatomische Untersuchungen zum Überkreuzungsverhalten des Nervus opticus beim Primaten"
10/2001-03/2008	Studium der Biologie an der TU Darmstadt, Schwerpunktfächer Tierphysiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie und Bionik
06/2001	Abitur am Gymnasium Michelstadt
<b>Beruflicher Hintergrund</b>	
04/2008-08/2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU Darmstadt im Bereich der Systemischen Neurophysiologie, Fachbereich Biologie

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Menschen bedanken, die mich in den vergangenen Jahren begleitet und dazu beigetragen haben, diese Dissertation anzufertigen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Galuske für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas, die Möglichkeit zur Durchführung der Promotion in seiner Arbeitsgruppe und die wissenschaftliche Freiheit bei der Gestaltung dieser Arbeit. Des Weiteren danke ich ihm für seine Diskussionsbereitschaft und die Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. Bodo Laube möchte ich für die Übernahme des Koreferats und seine tolle und immer hilfsbereite Arbeitsgruppe danken.

Herrn Prof. Dr. Jochen Triesch und Herrn Prof. Dr. Constantin Rothkopf möchte ich für die Hilfe bei der Analyse der Daten und die vielen Diskussionen im Rahmen der Kooperation danken.

Meinen Kollegen Christine Zschau und Klaus von Wangenheim danke ich für die vielen gemeinsamen Diskussionen über Neurolucida und ihre immerwährende Bereitschaft über alles mit ihnen reden zu können.

Kirsten Wehner und Linda Wiesinger danke ich für ihre sehr gute Organisation und Unterstützung im Hintergrund der Arbeitsgruppe und besonders für ihre aufmunternden Worte, wenn mal wieder nicht alles nach Plan lief.

Allen Mitglieder der Arbeitsgruppe, insbesondere meinen Kollegen Sebastian Vögler, William Barnes, Fabian Hoffmann, Miriam Müller, Katharina Schmitz, Anna Otte und Oriana Chiry Weber danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente und der Datenanalyse, sowie für die vielen gemeinsamen Diskussionen über unsere Arbeiten und die tolle Zusammenarbeit in allen Bereichen unseres Unilebens. Es war eine tolle Zeit, an die ich mich gerne zurückerinnern werde.

Meinen Freunden Ina, Frank, Annika, Marion, Hubert, Diana, Andreas, Sabrina, Katharina, Melanie, Manuel, Melli, Peter, Nicole und meinen Sportkameraden danke ich für die vielen gemeinsamen Stunden und die tollen Freundschaften.

Frank Schleicher danke ich für die Geduld mit mir und das Vertrauen in mich. Du und deine Familie haben meine Entscheidung ohne Einschränkungen mitgetragen und mich immer unterstützt. Frank, ich freue mich sehr auf unser gemeinsames Leben.

Meinen Geschwistern Raphaela, Kenneth und Gerald mit Manuela und Elias danke ich für die große moralische Unterstützung.

Meinem Vater Klaus-Manfred danke ich für seine kritische Hinterfragungen all meiner Schritte, die dazu geführt haben, dass ich sicher meinen Weg gehen konnte. Meiner Mutter Brigitte danke ich für ihre liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen und für die Möglichkeit manchmal einfach nur ihr Kind sein zu können. Ich danke euch für die Möglichkeiten, die ihr mir eröffnet habt.

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, Juni 2013

---